



Kunnskap for en bedre verden

Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR) som verktøy for prosessvurdering under produksjon av marine omega-3 konsentrat.

Andre Hanssen

Mat og teknologi

Innlevert: mai 2018

Hovedveileder: Eva Falch, IBT

Medveileder: Turid Rustad, IBT
Hanne Solvang Feberg, GC Rieber Oils

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Forord

Denne oppgaven er skrevet på oppdrag og samarbeid med GC Rieber Oils AS (Kristiansund). Bedriftsbesøk og produksjon av konsentrater ble utført 18-19 desember 2017. Laboratoriearbeidet ble utført på Institutt for bioteknologi og matvitenskaps laboratorium på Gløshaugen (Kjemi 3).

Først vil jeg takke Hanne Solvang Felberg og GC Rieber Oils AS for at jeg fikk muligheten til å samarbeide med dere på denne oppgaven. Satt veldig pris deres veiledning og oppmuntring gjennom oppgavens utførelse. Hannes gode humør selv når det kom «dumme» spørsmål ble spesielt satt pris på.

Jeg vil også takke overingeniør Torun Melø på NMR-laboratoriet for all hjelpen med å utføre analysene og opplæring i TopSpin. Vil også rette en takk til Veronica Hammer Hjellnes og Turid Rustad for hjelp til å finne frem på et ukjent laboratorium. Hadde sikkert leitet etter utstyr langt ut i neste semester hadde det ikke vært for dem.

En spesiell takk til 1.amanuensis Eva Falch for all tid, oppmuntring og tålmodighet du har viet til min oppgave. Hadde aldri kommet i mål uten hennes veiledning.

Avslutningsvis vil jeg takke min familie, venner og medstudenter som alle har bidratt til at dette har gått i mål.

PS: OneDrive/Dropbox redder liv.

Trondheim, 15 Mai 2018

André R. Hanssen

Sammendrag

Denne masteroppgaven har som mål å bruke kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR) til å analysere marine omega-3 konsentrater, da spesielt med tanke på kvaliteten og effekten av prosesseringen konsentratene gjennomgår. På grunn av flerumettede omega-3 fettsyrers helsefremmende egenskaper har etterspørselen av marine omega-3 fettsyrer økt kraftig siden tidlig på 2000-tallet. Fettsyrene er ettertraktede komponenter i mat, fiskefôr, helsekost og legemiddel. Marine omega-3-oljer inneholder en høy andel PUFA (flerumettede fettsyrer, da hovedsakelig dokosaheksaensyre (DHA) og eikosapentaensyre (EPA)) som gjør disse oljene ekstra ettertraktet i forhold til vegetabiliske oljer.

Under oppkonsentrering av EPA/DHA vil man få flere sidestrømmer i form av konsentrater med monoacylglyserol og diacylglyserol. Denne fraksjonen inneholder fremdeles store mengder høyverdig omega-3 fettsyrer. I disse tider er det et stort ønske om å utnytte slike restfraksjoner bedre. En måte å få dette til er øke kunnskapen om kvaliteten og sammensetning i slike reststrømmer. NMR er en god metode til å øke kunnskapen om lipidsammensetning. Da spesielt om de ulike lipidklassene og hvordan fettsyrene er posisjonert i molekylene.

I denne studien ble ^1H , ^{13}C og HSQC NMR eksperimenter brukt som metode. Eksperimentene er relativt enkel å utføre og er ikke destruktiv mot prøvematerialet, samtidig er analysene hurtig og gir veldig mye informasjon.

Det kan konkluderes med at NMR (^1H , ^{13}C og HSQC) er en god metode for å følge sammensetningen av ulike produktstrømmer gjennom oppkonsentrering av omega-3 produkter. Metoden gir veldig mye informasjon i forhold til tradisjonelle metoder, da spesielt med tanke på posisjonering av fettsyrene innad i lipidklassene. Den egner seg også godt til å se på uønskede kjemiske endringer som for eksempel oksidasjon i en prosessering av slike produkter.

Abstract

This master thesis aims at using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) to analyze marine omega-3 concentrates, especially considering the quality and efficacy of the processing concentrates undergo. Due to the health promoting properties of omega-3 fatty acids, the demand for marine omega-3 fatty acids have increased significantly since the early 2000s. The fatty acids are sought after components in food, fish feed, health food and pharmaceuticals. Marine omega-3 oils contain a high proportion of PUFA (polyunsaturated fatty acids, mainly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA)) which make these oils extra sought after compared to vegetable oils.

During the concentration of EPA / DHA, more side currents will be obtained in the form of concentrates with monoacylglycerol and diacylglycerol. This fraction still contains large amounts of high-grade omega-3 fatty acids. In these times, there is a great desire to better utilize such residual fractures. One way to do this is to increase the knowledge of the quality and composition of such residual flows. NMR is a good method for increasing the knowledge of lipid composition. Especially about the different lipid classes and how the fatty acids are positioned in the molecules.

In this study, ^1H , ^{13}C and HSQC NMR experiments were used as methods. The experiments are relatively easy to perform and are not destructive to the sample material, while the analyzes are quick and provide a lot of information about the sample material.

It can be concluded that NMR (^1H , ^{13}C and HSQC) is a good method of following the composition of different product streams through the concentration of omega-3 products. The method provides a lot of information in comparison to traditional methods, especially regarding positioning of the fatty acids within the lipid classes. It is also an excellent method to investigate undesired chemical changes such as oxidation in a processing of such products.

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Introduksjon og bakgrunn for oppgaven	1
1.1	Lipider	3
1.2	Omega fettsyrene	4
1.3	Acylglyseroler	5
1.3.1	Monoacylglyseroler (MAG)	5
1.3.2	Diacylglyseroler (DAG)	5
1.3.3	Triacylglyseroler (TAG)	6
1.4	Etylestere	7
1.5	Marine lipider	7
1.5.1	Lipid oksidasjon relatert til marine lipider	9
1.6	Prosessering av råoljer	10
1.7	Raffinering av olje	11
1.8	Oppkonsentrering av omega-3 fettsyrer	12
1.8.1	Molekylær destillasjon	14
2	Analytiske metoder	16
2.1	Væskekromatografi og gasskromatografi	16
2.2	Kjernemagnetisk resonans spektroskopi	16
2.2.1	^1H NMR	18
2.2.2	^{13}C NMR	19
2.2.3	^1H - ^{13}C HSQC	20
3	Materialer og metode	21
3.1	Molekylær destillasjon	21
3.2	NMR – ^1H , ^{13}C og HSQC	21
3.3	Programvare brukt i oppgaven	22
4	Resultat og diskusjon	23
4.1	Prosessuttak og screening	23

4.2	Enzymatisk konsentrasjon mot molekylær destillasjon – uønskede kjemiske endringer	24
4.3	Relativt innhold av lipidklasser	27
4.4	Lipidklasse posisjonering.....	28
4.5	Oppsummering av resultater og diskusjon	31
5	Konklusjon.....	32
6	Videre arbeid.....	33
7	Vedlegg	34
7.1	Vedlegg 1 – Utfyllende informasjon for prøvene i studien.....	34
8	Litteraturliste	1

1 INTRODUKSJON OG BAKGRUNN FOR OPPGAVEN

På grunn av flerumettede omega-3 fettsyrers helsefremmende egenskaper har etterspørselen av marine omega-3 fettsyrer økt kraftig siden tidlig på 2000-tallet. Fettsyrene er ettertraktede komponenter i mat, fiskefôr, helsekost og legemiddel (Standal et al., 2011). Marine omega-3-oljer inneholder en høy andel PUFA (flerumettede fettsyrer, da hovedsakelig dokosaheksaensyre (DHA) og eikosapentaensyre (EPA)) som gjør disse oljene ekstra ettertraktet i forhold til vegetabiliske oljer. DHA og EPA har dokumenterte helseeffekter mot hjerte- og karsykdommer, positiv effekt på utviklingen av hjernen til spebarn, samt at de kan forbedre symptomene for leddgikt (Frøyland et al., 2011, Standal et al., 2017). Hovedkilden til flerumettede omega-3 fettsyrer i dagens kosthold kommer enten fra fet fisk (laks, ørret, makrell og sild), kosttilskudd (tran, omega-3 kapsler etc.) eller mat som er tilsatt fiskeoljer (Helsedirektoratet, 2011). Bevisstheten rundt helseeffektene fra marine omega-3 fettsyrer har ført til at det globale markedet for fiskeoljeprodukter er i sterk vekst. Norge var i 2005 den største importøren av fiskeoljer, ca. 40 % av verdens omega-3 fettsyre relaterte oljeprodukter til humankonsum var da produsert i Norge (Aursand et al., 2011). Den globale markedsverdien for Omega-3 var rapportert til å være 2.04 milliarder USD i 2016, med en forventet økning på 6.6 % fram mot 2022 (Research, 2018).

GC Rieber Oils AS er en internasjonal aktør innen videreforedling av fiskeoljer. Deres fabrikk i Kristiansund tar inn råolje av høy kvalitet fra Sør-Amerika (Chile og Peru hovedsakelig). Oljene blir destillert, konsentrert, syntetisert, kaldfiltrert, deodorisert og eventuelt tilsatt vitaminer og antioksidanter før den er klar til salg. Råoljen er dermed blitt en høykvalitets omega-3-olje/konsentrat som selges videre til industrielle aktører innen helsekost og næringsmiddelbransjen globalt. Den totale omega-3 fettsyrekonsentrasjonen ligger mellom 70 og 90 % i produktene til GC Rieber (GC-Rieber, 2017).

GC Rieber utfører en del egne analyser av sine oljer, blant annet på HPLC (væskekromatografi) og GC (Gasskromatografi). Disse analysene vil gi informasjon om lipidklasser (blant annet triacylglyserol og partielle glyseroler), fettsyrer, peroksid- og anisidin-nivåer (TOTOX) i oljene.

Det er derfor interessant å bruke kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR) til å se på andre effekter produksjonsprosessen kan ha hatt på produktene og sidestrømmene til produksjonen. Ved å bruke NMR teknikker kan man få mer informasjon enn ved de vanlige analysene, da spesielt på posisjonen av fettsyrene og dannelse av oksidasjonsprodukter.

Under oppkonsentrering av EPA/DHA vil man få flere sidestrømmer i form av konsentrater med monoacylglyserol og diacylglyserol, denne fraksjonen inneholder fremdeles store mengder høyverdig omega-3. GC Rieber Oils i Kristiansund produserer for øyeblikket ca. 60 tonn i året med DAG oljer, etter sommeren 2018 vil de doble kapasiteten til ca. 120 tonn pr år (GC-Rieber, 2017). Ved å se på stereoisomerien til disse oljene kan man bruke informasjonen enten til å optimalisere prosessen; benytte andre typer enzymer som er mer spesifisert for å øke utbyttet av EPA/DHA eller se om strukturen til mono- og diacylglyserolene er gunstig til å brukes til andre produkter. Monoacylglyserol har gode emulgeringsevner (Gunstone, 1991b, Gunstone, 2004), så ved å påvise at for eksempel DHA/EPA sitter på en gunstig posisjon i glyserolmolekylet vil man kunne be om en høyere pris på et slikt produkt. Det er i disse tider stort fokus på å utnytte sidestrømmer bedre. Med tanke på at sidestrømmene fra omega-3 konsentrater fremdeles inneholder store mengder omega-3 fettsyrer vil det være naturlig å utforske mulighetene for å få bedre utnyttelse av dem. Derfor er det viktig å samle inn mer informasjon om restfraksjonene, det er kan være NMR nyttig.

Målet med oppgaven ble derfor som følger:

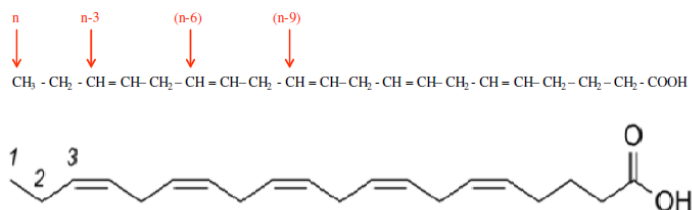
- Se om det var forskjeller på de oljene som er konsentrert med enzymer kontra de som er konsentrert videre ved molekylær destillasjon. Da med fokus på de uønskede kjemiske endringer som for eksempel oksidasjon.
- Prøve å kvantifisere innholdet i oljene for å se om det er forskjellige resultat på NMR i forhold til generelle analysemetoder som HPLC og GC.
- Se på fettsyreposisjonen på mono- og diacylglyserolene i sidestrømmene fra konsentrasjonsprosessen. Da hovedsakelig på sidestrømmen som stammer fra enzymatisk konsentrering.

Denne oppgaven vil ta for seg relevant teori knyttet til temaet i oppgaven, metoden som har blitt brukt for å løse forskningsspørsmålene, presentasjon av funn og resultater samt vurdering og konklusjon. Målgruppen for denne oppgaven er forskere, studenter og andre med interesse for temaet. Det påberegnes at leseren av denne oppgaven har forkunnskaper rundt tematikken, herunder kjemi og prosess teknologi.

1.1 LIPIDER

Fettsyrer er essensielle byggeklosser for alle lipider (Gunstone, 2004). Lipider kan deles inn i to hovedgrupper, i flytende form (olje) eller fast form (fett) ved romtemperatur. Det finnes et stort mangfold av lipidformer, eksempelvis upolare lipider som triacylglyserol og kolesterol eller polare lipider som fosfolipider (Gunstone, 2004, Alexandri et al., 2017). Naturlige fettsyrer er bygd opp av kjeder med et partall antall karbonatomer. Fettsyrer kan ha alt fra 2 til 80 karbonatomer men de mest vanlige har mellom 12 og 22 karbonatomer i kjeden. De blir klassifisert etter grad av metning. Beskrivelsen «mettet», «enumettet» eller «flerumettet» forteller om fettsyren har henholdsvis ingen, en eller flere dobbeltbindinger i karbonkjeden (Aursand et al., 2011, Gunstone, 2004). Umettede fettsyrer er ofte olefinisk, det vil si at de har en *cis* konfigurasjon i dobbeltbindingene (Gunstone, 2004). Fettsyrer består av en alifatisk hydrokarbonkjede ($-CH_2-$), en karboksylgruppe ($-COOH$) og en metylgruppe ($-CH_3$) på den terminale enden. Nomenklaturen for fettsyrer beskriver antall karbonatomer, dobbeltbindinger og hvor den første dobbeltbindingen (*n*-) befinner seg i forhold til metylenden av molekylet. For eksempel vil *n*-6 derfor bety at dobbeltbindingen kommer mellom det 6. og 7. karbonatomet i kjeden (Figur 1). Tidligere ble tegnet ω (omega) brukt for å beskrive hvor dobbeltbindingene er lokalisert i fettsyrer, derav navnet omega fettsyrer.

Fettsyren eikosapentaensyre (EPA) har 20 karboner og 5 dobbeltbindinger. Den første dobbeltbindingen befinner seg mellom 3. og 4. karbonatom fra metylenden, altså *n*-3 som vist i Figur 1. Eikosapentaensyre blir derfor en omega-3 fettsyre (EPA 20:5, *n*-3) (Gunstone, 2004, Aursand et al., 2011, Alexandri et al., 2017).



Figur 1: Struktur og nomenklatur for den flerumettetede fettsyren eikosapentaensyre (EPA 20:5 n-3). Redigert fra VKM rapport fra 2011 (Aursand et al., 2011).

1.2 OMEGA FETTSYRENE

Kroppen syntetiserer de fleste fettsyrer den trenger, utenom noen fettsyrer i omega-3 (n-3) og omega-6 (n-6) familien. Fettsyrene linolsyre (LA, 18:2 n-6) og α -linolensyre (ALA, 18:3 n-3) må tilføres via kosten (Helsedirektoratet, 2011, Calder, 2012). Eikosapentaensyre (EPA, 20:5 n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6 n-3) er også med i denne familien av fettsyrer, kroppen kan syntetisere disse fettsyrene fra LA og ALA men syntetiseringshastigheten er så lav at de må tilføres via kosthold (Frøyland et al., 2011, Aursand et al., 2011, Calder, 2012).

Omega-3 fettsyrene bidrar til flere positive virkemekanismer i kroppen. De er med på å regulere konsentrasjoner av metabolitter og hormoner som kan føre til endret adferd i celler og vev. De har også en direkte påvirkning på vev og celler via overflate eller intracellulære fettsyrereseptorer (Calder, 2012). Fettsyrene er hovedkomponenter i biologiske membraner, da spesielt DHA som finnes i høye konsentrasjoner i øyner og hjerne. EPA bidrar til å regulere produksjonen av eikosanoider til arakidonsyre (ARA, 20:4 n-6) (Calder, 2012, Frøyland et al., 2011). For å kort oppsummere kan man si at EPA spiller en viktig rolle gjennom å regulere metabolittene i kroppen, mens DHA spiller en viktig rolle for det strukturelle. For å få dekket behovet for de essensielle fettsyrene anbefaler Helsedirektoratet (2011) at de bidrar med minst 3 prosent av energiinntaket (energiprosent, E%), inklusivt minimum 0,5 E% omega-3 fettsyrer.

Pasienter som enten fikk 0,8g EPA og DHA per dag eller 1,8 g EPA i form av etylester fikk redusert risiko for nye kardiovaskulære hendelser (for eksempel slag) og død. Disse resultatene kom fra store randomiserte og kontrollerte studier utført på mer en 43 000 pasienter med hjerte- og karsykdommer. Det finnes også studier som viser at fiskeoljer med 1,6 til 7,1 g EPA og DHA per dag lindrer symptomer for pasienter med reumatoid artritt (Frøyland et al., 2011). Det

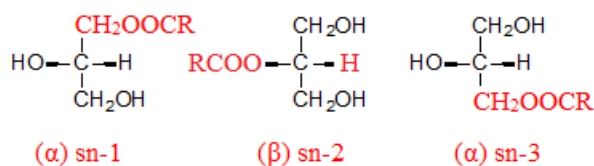
ble også rapportert om økt blødningstendens hos pasienter med hjerte- og karsykdommer som fikk 6,9 g EPA og DHA per dag. Disse pasientene fikk i tillegg blodfortynnende medisin. Det er imidlertid ikke rapportert om tilfeller av blødningskomplikasjoner i forbindelse med tilskudd av kun EPA og DHA (Frøyland et al., 2011).

1.3 ACYLGLYSEROLER

Når fettsyrer er koblet på en glyserol molekyl kalles det en acylglyserol, man finner acylglyseroler i tre former: mono-, di- og tri-acylglyserol. I oljer og fett er triacylglyserol den mest fremtredende formen. Mono- og diacylglyseroler kan være til stede som enten mellomprodukter fra biosyntesen eller som produkter av lipolysen (Gunstone, 2004).

1.3.1 Monoacylglyseroler (MAG)

Monoacylglyseroler eksisterer i to forskjellige former etter hvor fettsyren er acylert på glyserolmolekylet, primær-(α) eller sekundær (β) posisjon. Primærposisjon vil si at den sitter i sn-1 eller sn-3 posisjon på glyserolet, sekundærposisjonen er derfor sn-2 (Figur 2) (Gunstone, 2004).



Figur 2: Monoacylglyserol sn-1,2,3 stereoisomerer.

Monoacylglyseroler er godt egnet som emulgatorer og kan syntetiseres fra oljer og fett gjennom en prosess som kalles glyserolyse (Gunstone, 2004, Gunstone, 1991b).

1.3.2 Diacylglyseroler (DAG)

Diacylglyseroler eksisterer i symmetrisk form (sn-1,3) eller usymmetrisk form (sn-1,2 eller sn-2,3). Den symmetriske formen er mest stabil. Sn-1,2 formen av diacylglyserol er et viktig mellomprodukt i biosyntesen av triacylglyseroler og fosfolipider (Gunstone, 2004).

Ved produksjon av EPA/DHA konsentrater vil det kunne dannes en del diacylglyseroler som biprodukt i prosesseringen, spesielt i lipase-katalyserte reaksjoner. Lipaser klarer som regel ikke

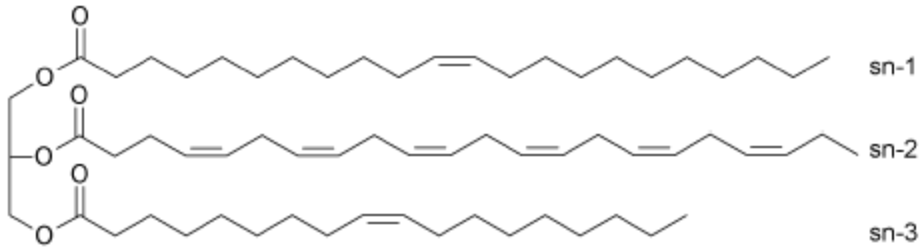
å spalte av alle EPA/DHA fra glyserolene i oljen. Disse diacylglyserolene har man så langt ikke oppnådd en god salgspris på selv om de inneholder store mengder høyverdige n-3 fettsyrer og i tillegg har andre interessante egenskaper (GC-Rieber, 2017).

Diacylglyserol oljer (DAG) ble først introdusert som et produkt med helsefremmende egenskaper av det Japanske selskapet Kao Corporation i 1999. Produktet ble kalt «ENOVA oil» og skulle brukes som matolje. DAG oljer har siden den gang blitt mer utbredt og man finner produkter av denne typen på markedet i Japan, USA, Canada, Australia og New Zealand. Oljene brukes i dag som matolje eller som ingredienser i bakervarer, pizza, fett og oljer, energi barer, måltidserstatte, frossen mat, supper og sauser for å nevne noen. DAG oljene er laget av vegetabilsk råstoff (soya, canola (canadisk raps) og mais) og de inneholder ca. 80 % diacylglyseroler (DAG), 20% triacylglyseroler (TAG), 3 % monoacylglyseroler (MAG) og små mengder emulgatorer og antioksidanter (Hatzakis et al., 2011). Yanai et al. (2007) rapporterte at DAG-oljeforbruk forbedrer bestanddelene i metabolsk syndrom (en gruppe risikofaktorer som disponerer for hjerte- og karsykdommer) som for eksempel overflødig adipositet (fedme), svekket glukosemetabolisme og dyslipidemi (forstyrrelse av lipidstoffskifte), noe som tyder på at DAG-olje kan brukes for å håndtere eller forebygge metabolsk syndrom.

Det Japanske firmaet Kao Corporation påstår at: «Å substituere vanlig vegetabilsk olje med DAG olje kan gi bedre forutsetninger for å oppnå vekt reduksjon.». Deres søknad om å selge slike produkter med denne helsepåstanden i Europa er fremdeles under behandling hos EFSA (The European Food Safety Authority). EFSA konkluderte i første omgang med at det enda ikke er godt nok dokumentert at man oppnår den påståtte helseeffekten ved å erstatte vanlige vegetabilsk oljer (TAG) med DAG-olje (EFSA Panel on Dietetic Products and Allergies, 2011).

1.3.3 Triacylglyseroler (TAG)

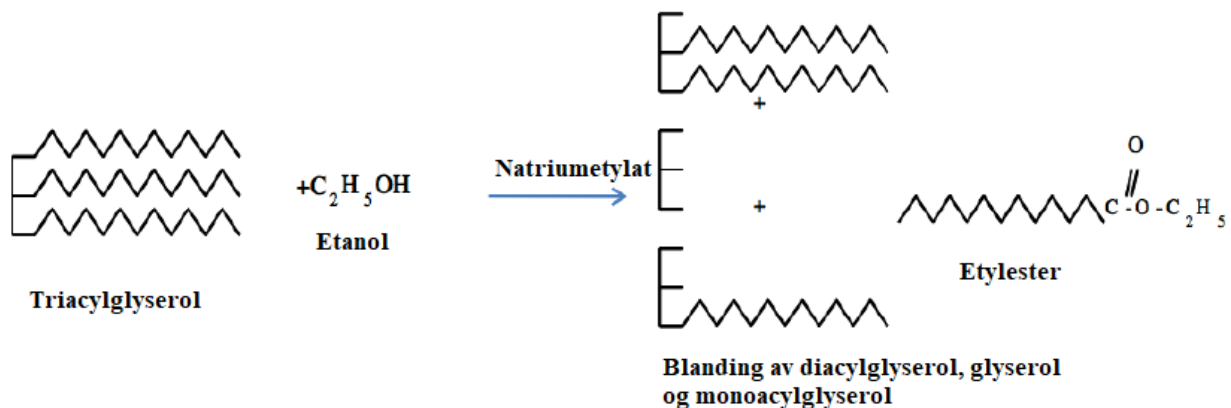
Triacylglyseroler er den vanligste formen for lipider, og som navnet tilsier består molekylet av tre fettsyrer. Det er uvanlig at alle fettsyrene på ett triacylglyserol er like, som regel vil det være to til tre forskjellige fettsyrer bundet til glyserolet (Figur 3) (Gunstone, 2004). I råolje av anchoveta og sardin er det blitt påvist at EPA vanligvis står i sn-1,3 posisjon mens DHA primært okkuperer sn-2 posisjonen på glyserolmolekylet (Suárez et al., 2010, Standal et al., 2011).



Figur 3: Triacylglycerol (TAG) struktur med umettede fettsyrer (Standal, 2009).

1.4 ETYLESTERE

Etylestere kan lages både kjemisk og enzymatisk, men det er mest vanlig å bruke den kjemiske metoden (se Figur 4). Etylering er en alkoholyse (kan bruke etanol eller metanol som løsemiddel). Målet med etyleringen er å spalte fettsyrene fra glyserol «skjelettet» og omdanne dem til en form der fettsyrene foreligger enkeltvis til man skal oppkonsentrere dem. I produksjon av etylestere blir raffinert fiskeolje blandet med etanol og en katalysator (natriumetylat for eksempel) ved 80 °C, under vakuum (Figur 4). Resultatet blir da en olje som inneholder etylestere, glyserol og mono- og diacylglycerol (Aursand et al., 2011).



Figur 4: Produksjon av etylestere. Modifisert fra VKM rapport fra 2011 (Aursand et al., 2011).

1.5 MARINE LIPIDER

Fiskeoljer består hovedsakelig av triacylglyceroler, på generelt grunnlag er mer enn 95 % av fettsyrene er bundet i TAG (Zamora and Hidalgo, 2006). De flerumettede omega-3 fettsyrene som er karakteristisk fisk er produsert av fytoplankton (alger) som akkumuleres videre opp i

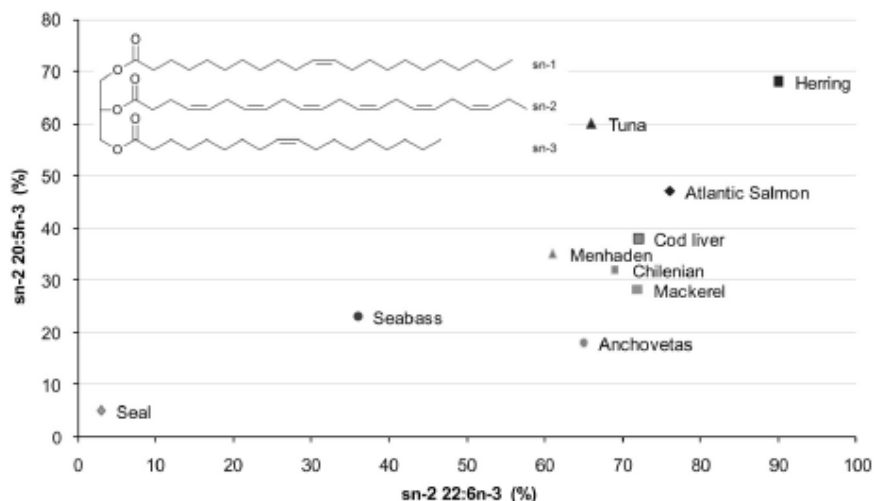
næringskjeden (se oversikt av de fettsyresammensetning av de vanligste fiske artene til oljeproduksjon i Tabell 1). Fisk klarer ikke syntetisere omega-3 fettsyrer selv. Som man kan se under har artene varierende sammensetning av fettsyrer. Sesongvariasjonen og fangstlokasjon påvirker også fettsyresammensetningen, til og med innad i artene. I magre fiskearter som torsk vil mesteparten av triacylglyserolene være i leveren, mens i fet fisk som sild og lodde finner man triacylglyserolene under huden (Haraldsson, 1999).

Tabell 1: Fettsyresammensetning (prosent av totalfett) av marine arter som brukes i oljeproduksjon. Tilpasset fra Aursand et al. (2011)

Fettsyre	Atlantisk laks (oppdrett)	Sild	Atlantisk torsk (lever)	Sør-amerikansk ansjos	Sardin	Lodde	Atlantisk menhaden	(Jack) Makrell
14:0	4.1	7	3.3	7.5	8	7	7.3	7.3
16:0	15.7	16	13.4	17.5	18	10	19	15.7
16:1 n-7	5.1	6	9.6	9	10	10	9.1	5.1
18:0	4.2	-	2.7	4	-	-	4.2	3.1
18:1 n-9	16.5	13	23.4	11.6	11	14	13.2	9.9
18:1 n-7	3.5	-	-	-	-	-	-	2.9
20:1 n-9	3.3	12	7.8	1.6	4	17	2	8.3
22:1 n-9	2.5	20	5.3	1.2	3	14	0.6	5.8
18:2 n-6	6.6	-	-	1.2	-	-	1.3	1.7
20:5 n-3	7.1	5	11.5	17	18	8	11	10.9
22:6 n-3	15.7	6	12.6	8.8	9	6	12.6	11.5
22:5 n-3	3.9	-	1.6	1.6	-	-	1.6	2
Total n-3 flerumettede fettsyrer	26.7	11	25.7	27.4	27	14	22	24.4

Ved å analysere triacylglyserol-strukturen i marine oljer ved NMR, kan man påvise hvilken art oljene kommer fra, siden posisjoneringen til EPA og DHA på glyserolmolekylet er karakteristisk for de forskjellige artene. ¹³C NMR analyser har vist seg å være svært anvendelig til å identifisere fingeravtrykket til forskjellige marine arter (Standal et al., 2011, Standal, 2009). ¹³C NMR spektroskopi gir informasjon om lipidklasser og regionspesifikk distribusjon av de flerumettede fettsyrene på triacylglyserolet (da spesielt på sn-2 posisjon). Ved å spesifikt se på DHA og EPA i sn-2 posisjon kan man identifisere hvilken fiskeart lipidene kommer fra. Figur 5

viser resultater fra en tidligere utført NMR analyse av omega-3 i sn-2 posisjon (Standal et al., 2011).



Figur 5: Viser sn-2 regionspesifisiteten i et utvalg av marine lipider (Standal et al., 2011).

1.5.1 Lipid oksidasjon relatert til marine lipider

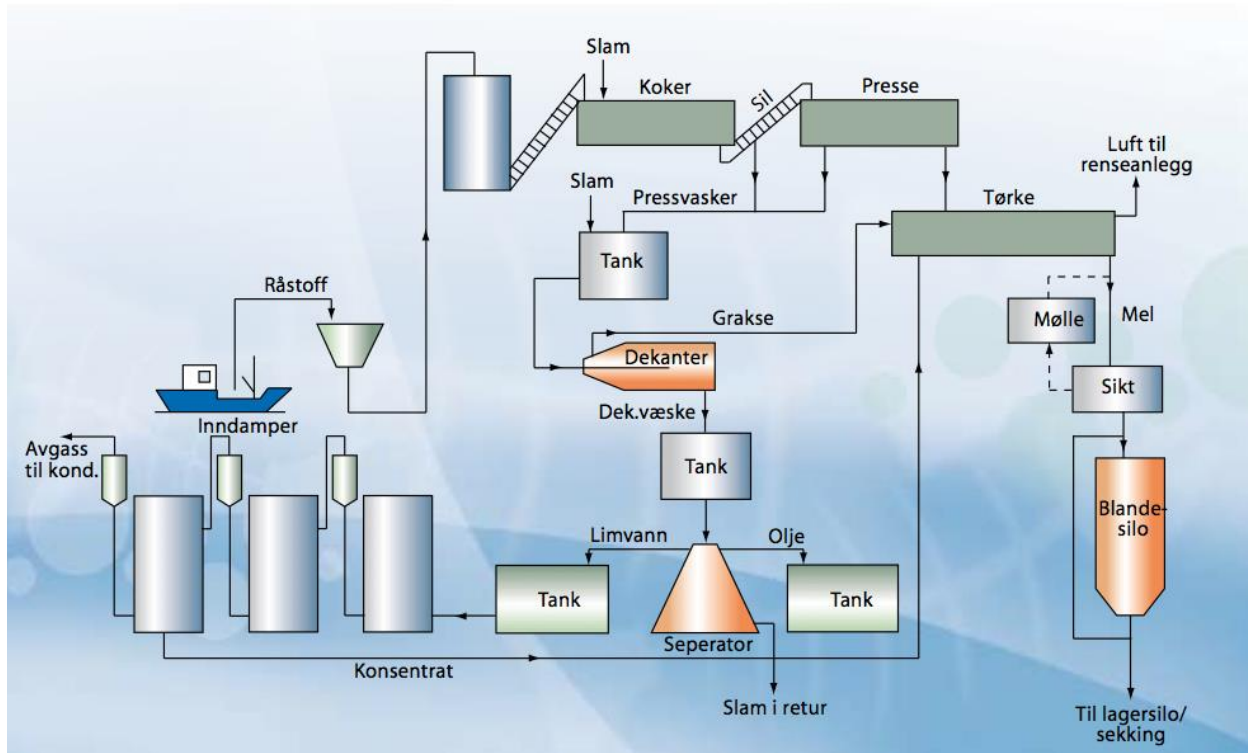
Marine oljer er veldig utsatt for oksidasjon på grunn av deres høye innhold av dobbeltbindinger i karbonkjeden. Som følge av dette kan en rekke uønskede komponenter dannes (Falch, 2006). Det er kjent at fettsyrer med mer enn to dobbeltbindinger kan produsere signifikante mengder hydrogenperoksider tidlig i oksidasjonsforløpet. Umettede fettsyrer i acylglyseroler kan også polymerisere eller syklisere seg som følge av dette (Falch, 2006). Under auto-oksidasjonen blir hydroperoksider dannet som primære oksidasjonsprodukt, som igjen kan omdannes til sekundære oksidasjonsprodukter som ketoner, aldehyder, alkoholer og syrer (Falch et al., 2004).

Under oksidasjon av umettede fettsyrer fra fisk er de vanligste oksidasjonsproduktene *trans*-2-pentanal, *trans*-2-hexanal, *cis*-4-heptanal, (*trans, trans*)-2,4-heptadienal og 2,4,7-dekatrienal. Det kan også dannes andre flyktige komponenter som 1-pentenal-3-ol, 1-octen-3-ol, 1,5-octadien-3-one og 2,6-nonadienal (Iglesias and Medina, 2008).

1.6 PROSESSERING AV RÅOLJER

I følge VKM (Vitenskapskomiteen for mat og miljø) sto Norge for ca. 40 % av verdens produksjon av marine omega-3 oljer til humankonsum (Aursand et al., 2011). Mesteparten av produktene blir produsert av råoljer importert fra Sør-Amerika, da hovedsakelig Chile og Peru. GC Rieber Oils importerer også oljer derfra og de består av råolje fra artene anchoveta (*Engraulis ringens*) og sardin (*Sardina pilchardus*) (GC-Rieber, 2017). Det produseres også omega-3 oljer/produkter av norsk råstoff. Dette kan for eksempel være fra torskelever, avskjær fra sild og laksenæringen, krill, raudåte (fikk tillatelse i desember 2017 til å produsere for humankonsum i EU (Calanus, 2017) og selspekk (Aursand et al., 2011).

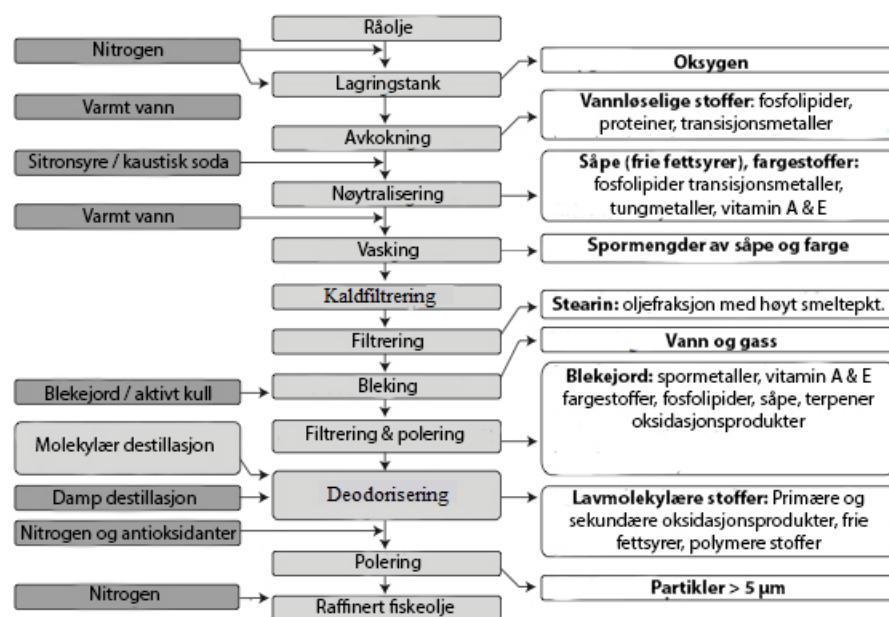
Råstoffet består som regel av 3 fraksjoner: fast stoff, olje og vann. For å lage råoljen må man fjerne lipidfraksjonen fra de to andre fraksjonene (se Figur 6). Råoljen blir prisjustert etter hvor stor konsentrasjonen av frie fettsyrer, vanninnhold/fuktighet, tilstedeværelse av urenheter, farge, peroksid- og ansidin-verdier (TOTOX) den inneholder (Aursand et al., 2011).



Figur 6: Flytskjema: fra råstoff til mel og råolje, hentet fra RUBIN 2007 (Bekkevold and Olafsen, 2007).

1.7 RAFFINERING AV OLJE

For å raffinere råolje til humankonsum kan man benytte seg av en rekke prosesser: nøytralisering, vasking, kaldfiltrering, bleking, deodorisering og molekylær destillering/SPD (short path distillation). Figur 7 illustrerer ett flytskjema for en slik prosess (Aursand et al., 2011, Gunstone, 2004, Jacobsen et al., 2009).



Figur 7: Flytskjema: råolje til raffinert fiskeolje. Modifisert fra Jacobsen et al. (2009)

Nøytraliseringsprosessen utføres for å fjerne frie fettsyrer, redusere innholdet av fosfolipider, pigmenter og spormetaller. Råoljen blir varmet opp til ca. 80-95 °C og tilsatt lut for å nøytralisere de frie fettsyrene. Det blir så tilsatt varmt vann og blandet grundig før såpevannet som blir dannet separeres ut i en separator. Vaskeprosessen fjerner også vannløselige komponenter som proteiner av type di-peptider, frie aminosyrer, trimetyl aminer og histidin. Den vil også fjerne delvis hydrolyserte fosfolipider og oksidasjonsprodukter fra lipider. Restråstoffet fra dette prosesstrinnet kan brukes til såpe eller fôr, det er ikke egnet som humankonsum (Gunstone, 2004, Aursand et al., 2011).

Kaldfiltrering utføres for å redusere mengden mettede triacylglyseroler og vokspartikler. Disse komponentene vil føre til at oljen er uklart/tåkete ved lave temperaturer. Prosessen utføres ved

å senke temperaturen til 0-2 °C, da vil det dannes krystaller av triacylglyserol som man kan filtrere bort (Aursand et al., 2011, Gunstone, 2004).

Bleking utføres for å fjerne pigmenter (samt rester av fosfolipider, såper/voks, spormetaller og oksidasjonsprodukter (peroksider). Dette gjøres ved å varme opp oljen til ca. 130-150 °C og tilsetning av blekejord (bentonitt, fullerjord eller aktivert karbon). Ved bruk av aktivert karbon som blekemiddel kan man fjerne rester av polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH), dioksiner og furaner. En ulempe ved bleking er at man også vil fjerne en del fettløselige komponenter som vitamin A, D, og E og Astaxanthin om man har råstoff som inneholder dette. Under denne prosessen kan det formes trans-bindinger i fettsyrene som følge av varmen. (Gunstone, 2004, Jacobsen et al., 2009, Aursand et al., 2011).

Deodorisering har som mål å fjerne store deler av de flyktige forbindelsene (for eksempel sekundære oksidasjonsprodukter som aldehyder, ketoner, epoksider og trioler) som gir vond lukt og smak. Det kan også fjerne rester av pigmenter og frie fettsyrer i denne prosessen. Oljen blir dampet av under vakuum ved høy temperatur (150-250 °C) for å minimere skaden av oksidering under prosessen. De flyktige komponentene vil følge dampen og dampfasen blir derfor kontinuerlig fjernet fra prosessen for å hindre rekontaminering (Aursand et al., 2011, Gunstone, 2004). GC Rieber utfører også en tynnfilm deodorisering av sine oljer før oljene blir tappet på tanker, da får man fjernet eventuelle sekundær og tertiær oksidasjonsprodukter.

1.8 OPPKONSENTRERING AV OMEGA-3 FETTSYRER

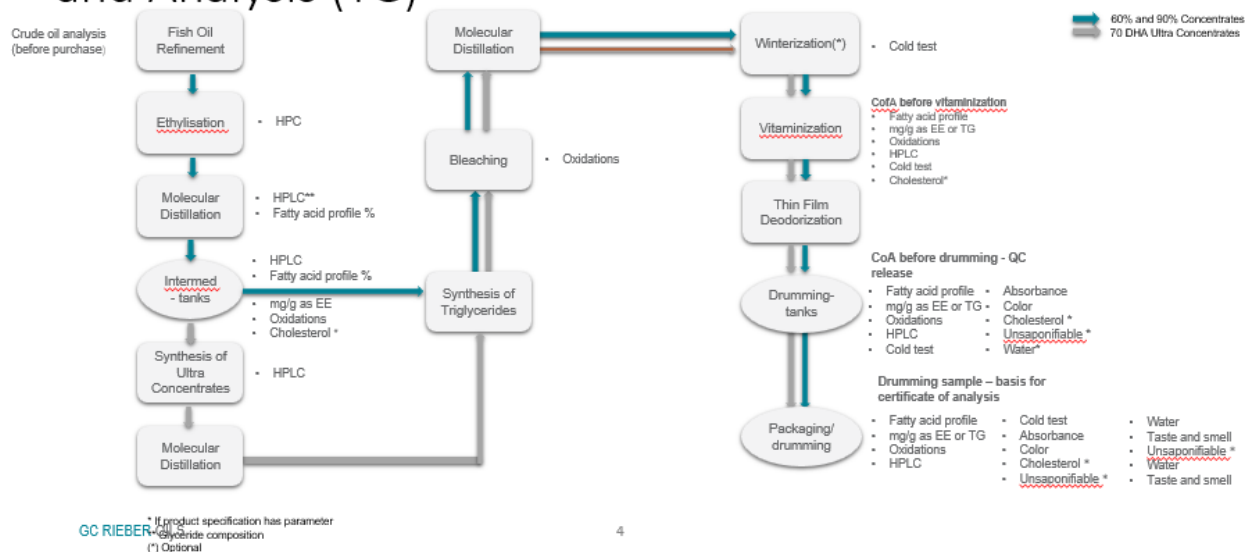
Marine lipider har en kompleks fettsyresammensetning. Det brukes derfor flere metoder for å produsere n-3 konsentrater. Metodene som kan benyttes er kromatografi, fraksjonering, molekylær destillasjon, enzymatisk modifisering, kaldfiltrering, krystallisering, superkritisk væskeekstraksjon og urea fraksjonering (Gunstone, 2004). Som regel benyttes en kombinasjon av disse metodene.

Re-syntetisering av triacylglyserol eller andre former for lipidstrukturer er ingen enkel prosess ved konvensjonell kjemiske metoder. Ved tradisjonell (kjemisk) esterifisering metoder kreves det høye temperaturer, trykk og ugunstige pH nivåer. Slike forhold vil delvis ødelegge *cis*-konfigurasjonen i EPA og DHA ved oksidasjon. Resultatet kan da bli *cis-trans* isomerisering eller

polymerisering av fettsyrene. Lipaser er derfor et skånsomt alternativ til den kjemiske prosessen fordi lipaser gjør tilsvarende reaksjoner under mildere forhold, lavere temperatur og trykk. Lipasene er også stabile i organiske løsemidler og de fungerer som katalysatorer i tre type reaksjoner; hydrolyse, transfesterifisering og direkte esterifisering (Haraldsson, 1999, Halldorsson et al., 2003, Haraldsson et al., 1995).

For å lage olje med høy konsentrasjon av n-3 fettsyrer må man starte med en raffinert olje bestående av acylglyseroler (mono-, di- og triacylglyseroler) eller etylestere med små mengder mono- og diacylglyserol (se Figur 8 for flytskjema for GC Rieber Oils prosess). Triacylglyseroler (TAG) sees på som mer naturlig enn etylestere (EE), dette fordi fettsyrene naturlig forekommer som TAG i råolje. Det er derfor vanlig å produsere acylglyserol ved re-esterifisering eller transesterifisering (Aursand et al., 2011). Wijesundera et al. (2008) påviste at oljer med omega-3 fettsyrer i TAG form har høyere oksidativ stabilitet enn oljer med omega-3 fettsyrene i etylester form. Omega-3 fettsyrer i sn-2 posisjon i TAG var spesielt stabil.

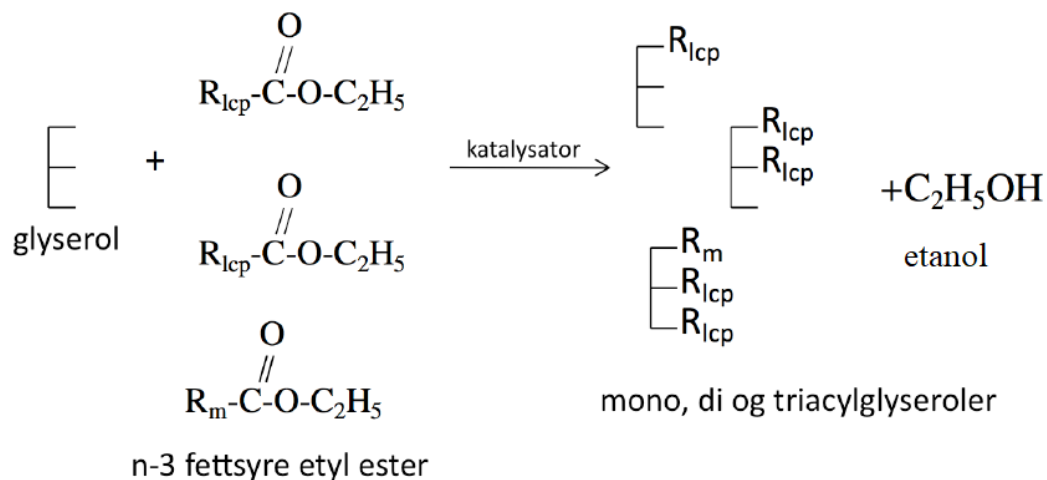
Production Quality - Production Process and Analysis (TG)



Figur 8: Flytskjema for GC Rieber Oils produksjonsprosess og analyser (GC-Rieber, 2017).

Re-esterifisering gjøres ved å tilsette glyserol, en kjemisk katalysator og etanol i den konsentrerte etylester oljen (Figur 9). Kontinuerlig superkritisk væskeekstraksjon må til for å

fjerne flyktige og uønskede biprodukter som dannes under re-esterifiseringen (Aursand et al., 2011).

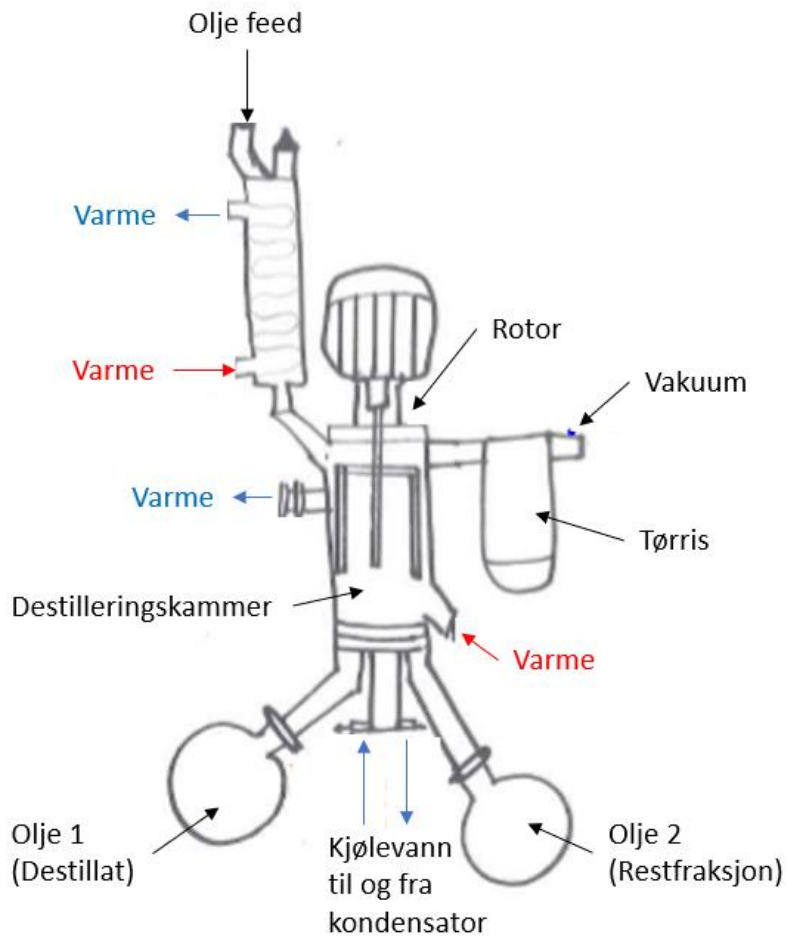


Figur 9: Re-esterifisering av fettsyrer i etylester form til mono-, di- og triacylglyseroler (R_{lcp} = langkjedede flerumettet fettsyre, R_m = enumettet fettsyre) (Aursand et al., 2011).

Trans-esterifisering deles inn i tre hovedgrupper; syrehydrolyse (reaksjon mellom en syre og en ester), alkoholyse (reaksjon mellom ester og alkohol (metanol og etanol)) og interesterifisering (fettsyrene bytter posisjon på glyserolene internt i triacylglyserolene) (Aursand et al., 2011).

1.8.1 Molekylær destillasjon

Molekylær destillasjon kan brukes til separering, rensing eller oppkonsentrering av oljer. Under prosessering av råolje brukes det til å fjerne forurensende stoffer som dioksiner, PCB og furaner (Aursand et al., 2011). Denne prosessen er bedre egnet for oljer til humankonsum enn andre prosessteknikker da den ikke trenger løsemiddel (som ikke kan brukes til humankonsum) som separasjonsmiddel, man unngår derfor problemer med toksisitet. I molekylær destillasjon føres destilleringsvæsken kontinuerlig nedover en varm sylindreformet fordampner (destilleringskammeret Figur 10), væsken fordampner gradvis og føres deretter videre til en kondensator i nærheten av fordampneren. I fordampneren har man lavt trykk, rundt 10^{-4} mmHg (0.0005 mBar), dette fører til at de fordampede molekylene fritt kan passere gjennom destillasjonsåpningen til kondensatoren.



Figur 10: Skisse av et molekylært destillasjonsanlegg. Figuren modifisert fra Eva Falch (tidligere presentasjon og undervisningsmateriell) og Martinello et al. (2008)

For å destillere væskeblandinger med lav varmestabilitet og lavt damptrykk kan man redusere destillasjonstemperaturen (senket med 200-250 °C i forhold til ved normalt trykk) for å forhindre varmenedbrytning av væskene. Dette kan gjøres ved å ha kort residenstid (10^{-1} til 10^1 sekund) for destilleringvæsken over fordampere samt en kort distanse mellom fordampere og kondensator (20–70 mm (Cvengroš et al., 2000)), også kalt kortveis destillasjon. Fordampingen av væsken over fordampersylinderen er en av de viktigste stegene i molekylær destillering. Væsken flyter over sylinderen som en tynn film (0.05-2 mm) for å gi en tilstrekkelig fordamping. Ved å ha forholdene som nevnt over i denne prosessen vil man få minimalt med varmenedbrytning av væsken (Fregolente et al., 2006). I denne oppgaven vil det bli utført analyser både på destillatene og restfraksjonene.

2 ANALYTISKE METODER

Denne studiens hovedformål var å bruke NMR som analyseverktøy til å studere hvordan fiskeoljene og sidestrømmene i konsentratprosessen hos GC Rieber ble påvirket av prosessen. Bedriften bruker selv væskekromatografi (HPLC) og gasskromatografi (GC) til å analysere sine produkter. Det blir brukt resultater fra deres laboratorium i denne studien.

2.1 VÆSKEKROMATOGRAFI OG GASSKROMATOGRAFI

Væskekromatografi er en effektiv analysemetode som brukes i bedrifter som holder på med oljer til humankonsum. Den kan brukes til å separere og analysere komponenter ved å distribuere dem mellom to faser (mobil og stasjonær fase) (Ho et al., 2003). Den stasjonære fasen (kolonnen) består av mikropartikler av silika- eller alkyl-bundet silika, mens den mobile fasen består av en løsemiddelblanding. HPLC systemets begrensning er at man nå ha tilpasset injeksjon- og høytrykkspumpe- system, passende deteksjonssystem (UV absorpsjon, differensial refraktometri eller fluorescens) etter hvilken analyse man skal kjøre (Gunstone, 2004). Enkelt forklart består et HPLC-instrument av seks komponenter: reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektor og skriverintegrator (Greibrokk et al., 2005).

Gasskromatografi er et kromatisk system som benytter mobilfase i gassform og stasjonærfase i enten væskeform eller fastform. GC utføres som kolonnekromatografi og komponentene i prøven separeres ved ulike kokepunkt. For å kjøre kvantitative analyser benyttes det en intern standard som referanseverdi. Et GC system består som regel av en injektor, kolonneovn, kolonne, detektor og skriver. Kolonneovnen kan reguleres isotermisk eller ved temperaturprogram (Greibrokk et al., 2005). GC metoder er vanlig å bruke når man skal beregne innhold av umettede fettsyrer i fisk og fiskeoljer. På grunn av den høye temperaturen i injektoren og kolonneovnen kan det oppstå «kunstig» oksidasjon i prøver med høy grad av umettethet, da spesielt om prøver som inneholder EPA og DHA (Siddiqui et al., 2003).

2.2 KJERNEMAGNETISK RESONANS SPEKTROSKOPI

De første NMR signalene ble først observert i 1945 av to fysikere med navn Bloch og Purcell, noe som de senere mottok Nobel pris innen fysikk for (1952). Kjemikere så fort nytteverdien i

den nye metoden for å analysere molekyler. Tidlig på 1950-tallet kom de første NMR instrumentene på markedet. Disse instrumentene hadde svake magnet felt i forhold til de som er tilgjengelig i dag. De vanligste NMR instrumentene kan operere mellom 200-800 MHz. I dag benyttes NMR spektroskopi instrumenter av kjemikere, fysikere, biokjemikere, legemiddel kjemikere og leger (Balci, 2005)

NMR spektroskopi er en analytisk metode som kan detektere nesten alle molekylers magnetisme ved å stråle de ved en spesifikk radiofrekvens. NMR teknikken har utviklet seg til å bli en viktig metode for å analysere organiske forbindelser. De vanligste atomkjernene er ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{19}F , ^{31}P . Når man skal analysere lipider er det hovedsakelig ^1H , ^{13}C og ^{31}P som benyttes (Falch, 2006).

Resonansen man får oppgitt fra NMR er uttrykt som kjemisk forandring (δ) i ppm (parts per million) som måles opp mot en referanseforbindelse som for eksempel tetramethylsilane $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ($\delta = 0.0$ ppm) for ^1H . De kjemiske forandringsverdiene er påvirket av molekylets struktur, løsemiddel, konsentrasjon og pH (Falch, 2006).

^1H og ^{13}C NMR spektroskopi vil kunne gi informasjon om hvor mange hydrogen og karbon som finnes i molekylet, molekylstruktur samt bindingsstruktur (Balci, 2005).

Tradisjonelle metoder for å finne ut lipidsammensetningen i prøver er basert på ekstraksjon, noe som kan føre til ufullstendige prøver som kan mangle de ønskede komponentene man vil analysere. NMR på homogene væsker er en ikke destruktiv metode, da man slipper å utføre ekstraksjoner som kan skade prøvematerialet.

NMR kan blant annet differensiere mellom acylglyserol isomerer som 1-MAG og 2-MAG, 1,2-DAG og 1,3-DAG, samt forskjellige etylestere (DHA, EPA mot andre etylestere). NMR er derfor en god metode for å studere marine oljer (Falch et al., 2005, Standal et al., 2017). Den kan også brukes til å se på kvaliteten på fisk, lipidoksidasjon og lipolyse. ^{13}C - og ^1H -NMR kan kombineres for å få et bedre bilde av lipid sammensetning og kjemiske endringer i en olje. ^{13}C -NMR har bedre oppløsning på spektrene men den er ikke like sensitiv som en ^1H -NMR (Sacchi et al., 2006).

2 dimensjonale (2D) NMR teknikker gjør det lettere å tolke hva toppene i spekteret kan være. Signaler fra lipidmolekyler dukker opp på et smalt spekter, man vil derfor ha lav oppløsning og det er derfor lurt å kombinere ^1H -NMR med ^{13}C -NMR (Sacchi et al., 2006).

Noen eksempler på slike teknikker kan være:

- **COSY** (H,H)-korrelerte NMR spektroskopi setter sammen to spekter der man bruker de kjemiske skifteverdiene til ^1H korrelert opp mot hverandre (Aue et al., 1976). COSY er for øvrig den mest vanlige 2D metoden å bruke på NMR.
- **HSQC** (Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy) detekterer korrelasjoner mellom to forskjellige atomer, da for eksempel ^1H og ^{13}C , som er separert med ett bånd. Metoden gir derfor en topp per par koplete atomkjerner, koordinater fra de to blir da skifteverdien fra de to koplete atomene (Keeler, 2011).
- **HMQC** (Heteronuclear multiple quantum coherence) tillater å oppnå et korrelerende 2D kjemisk skifte bilde mellom direkte koplede ^1H - og ^{13}C -atomer. Denne teknikken er ofte brukt siden den er protonbasert og gir derfor en høyere sensitivitet i forhold til karbonbaserte deteksjonsmetoder som for eksempel HETCOR.
- **HETCOR** (Heteronuclear correlation) benytter seg av signaler fra alle protoner og ^{13}C kjerner som er forbundet i en ^{13}C , ^1H koplign på et bånd (Berger and Braun, 2004).

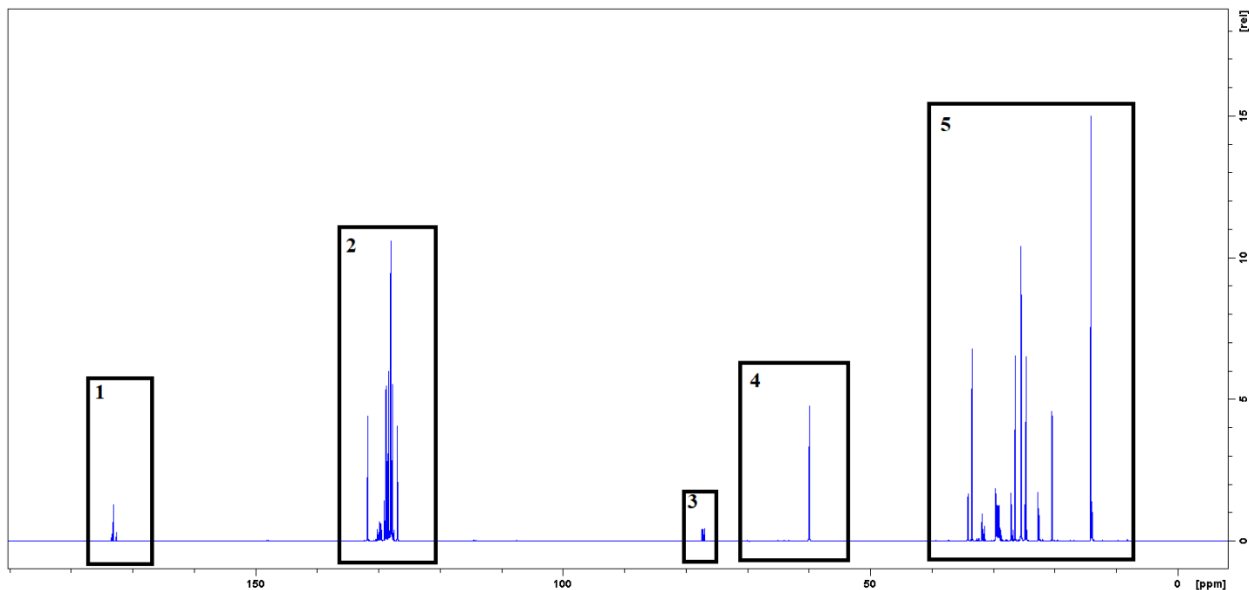
2.2.1 ^1H NMR

^1H er den mest vanlige atomkjernen i naturen (99,985 %) og er derfor den mest sensitive NMR testen man kan utføre. Hydrogen vil gi forskjellige signaler etter hvilket kjemisk miljø de er i. Toppene i et bestemt spekterområdet kan derfor tilordnes visse strukturelle elementer og mengden av forskjellige grupper i lipider kan bestemmes (Siddiqui et al., 2003). Fordelen med ^1H NMR er at den har høy sensitivitet og derfor kan benytte seg av kortere innsamlingstid per eksperiment. Man kan også oppleve å få overlappende signaler i ^1H spekter, dette på grunn av den lave oppløsningen (Standal et al., 2017). Gunstone (1991a) var en pioner på å identifisere flere av lipidkomponentene i fiskeoljer på proton spekteret. Flere av signalene til flerumettede fettsyrer (PUFA) komponenter ble dokumentert i hans arbeid på tidlig 1990-tallet (Sacchi et al., 2006).

2.2.2 ^{13}C NMR

^{13}C -kjernen har lav forekomst i naturen (1,108 %) og lav mottakelighet i forhold til ^1H . Dette kan tilskrives at ^{13}C har et stort kjemisk skiftområde (rundt 200 ppm) i forhold til det av ^1H (rundt 10 ppm). På grunn av betydelige fremskritt i NMR-instrumentering, bruk av allsidige puls-sekvenser og sofistikerte 2D ^1H - ^{13}C NMR eksperimenter er det derfor en allsidig teknikk til å analysere lipider (Siddiqui et al., 2003).

^{13}C NMR spektroskopi kan gi detaljert informasjon om hvilken lipidklasser og posisjonsfordeling fettsyrer har på glyserolmolekylet (Falch et al., 2005, Amin et al., 2007). Karbonylkarbon regionen ligger mellom 174-172 ppm på spekteret (område nr. 1 i Figur 11), verdiene vil korrespondere til karbonylkarbonene til de ulike fettsyrene som finnes i prøven. De kjemiske skiftene vil avhenge av typen ester (TAG, DAG eller MAG), stereospesifikke posisjoner (fettsyrer i α - (sn1,3) eller β -posisjon på acylglyserol (sn2)) og avstanden til nærmeste dobbeltbinding (Aursand et al., 2007, Standal et al., 2017). I den olefiniske regionen (område nr. 2 i Figur 11, 133 – 126 ppm) får man informasjon om de umettede fettsyrene. Omega-3 fettsyrer viser karakteristiske topper i denne delen av spekteret som følge av at det kjemiske skiftet blir påvirket av metyl-endene i området. Glyserolkarbon regionen (område nr. 4 i Figur 11, 72-61 ppm) gir verdifull informasjon om eventuelle kjemiske modifiseringer en råolje har gjennomgått. Glyserol resonansen blir påvirket av den stereospesifikke strukturen til glyserol og hvor fettsyrene er esterifisert, enkelt forklart: avstanden til nærmeste dobbeltbinding (Aursand et al., 2007).



Figur 11: ^{13}C spekter hvor 1 = Karbonylkarbon signaler (174-172 ppm), 2 = Olefiniske karbon signaler (133-126 ppm), 3 = CDCl_3 (løsemiddel topp), 4 = Glycerol signaler (72-61 ppm) og 5 = Alifatiske karbon signaler (35-15 ppm).

2.2.3 ^1H - ^{13}C HSQC

HSQC detekterer korrelasjoner mellom ^1H - ^{13}C kjerner som er separert av en binding. Denne metoden resulterer i en kryss-topp per par koblede kjerner hvis to koordinater er de kjemiske skiftene på ^1H (observerte kjerner) og ^{13}C (indirekte detekterte kjerner). Med dette eksperimentet kan man:

- Proton tildeling kan kartlegges direkte til deres bundet karbon, og kan derfor brukes til å spre komplekse ^1H -NMR spekter utover det mye større karbonspekteret.
- Kvantifisere mindre lipider selv i komplekse blandinger.

3 MATERIALER OG METODE

3.1 MOLEKYLÆR DESTILLASJON

Den 19-20 desember 2018, ble det utført molekylær destillering ved GC Riebers pilotanlegg i Kristiansund. Fiskeolje av anchoveta og sardiner (4229 EE) ble destillert til nye konsentrater. 6 prøver (17 ADS007 serien) ble hentet ut fra enzymatisk produksjon som ble foretatt 13 desember 2017. Det ble tatt ut 6 prøver (17 ADS009 serien) av forskjellige kutt under molekylær destillasjonen 19 desember 2017. Fra den rent destillerte oljen ble det laget ett destillat (ca. 10 %) og en restfraksjon (ca. 90 %). Restfraksjonen ble videre destillert til nye produkter ved forskjellige temperaturer. Ett nytt sett prøver ble destillert 12 januar 2018 på grunn av feil på destillasjonsutstyret under destillering av 17 ADS009 serien. De nye prøvene går under 18 ADS001, se Vedlegg 1 for rådata.

3.2 NMR – ^1H , ^{13}C OG HSQC

Fiskeoljene fra GC Rieber Oils AS (200 mg) er fortynnet med deuterium kloroform 99.8 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Tyskland) (0,5 ml) og overført til Wildmad LabGlass High Throughput NMR rør (5 mm). Prøvene ble kjørt ved 300 K / 26 C på en Bruker Avance 600 MHz spektrometer (Bruker BioSpin GmbH, Tyskland), det er tatt opp semikvantitative ^1H , ^{13}C og HSQC spekter. Følgende innsamlingsparametere er benyttet:

^1H : Pulsprogram zg30, spekterbredde 18 ppm, innsamlingstid 3 s, antall skanninger 24 og dummy skanninger 2. En eksponentiell forbedring på 0,30 Hz ble utført før Fourier transformasjon. Kjemisk skifteskala er referert til TMS til deuterium kloroform (CDCl_3) etter 7,28 ppm.

^{13}C : Pulsprogram zgig, spekterbredde 238,9 ppm, innsamlingstid 1,8 s, antall skanninger 124 og dummy skanninger 4. En eksponentiell forbedring på 1 Hz ble utført før Fourier transformasjon. Kjemisk skifteskala er referert til TMS ved tripletten til deuterium kloroform (CDCl_3) etter 77,16.

HSQC: Pulsprogram hsqcedetgpsisp2.3, spekterbredde F2 16 ppm, F1 165 ppm, innsamlingstid F2 0,05 s, F1 0,01 s, antall skanninger 2 og dummy skanninger 32. Kjemiske skifteskala er

referert til TMS ved tripletten til deuterium kloroform (CDCl_3) etter 77,16 ppm for ^{13}C og 7,28 ppm for ^1H .

Tolkningen av skifteverdier er basert på studier av (Suárez et al., 2010, Zamora and Hidalgo, 2006, Standal et al., 2017, Aursand et al., 2007, Brescia and Sacco, 2006b, Brescia and Sacco, 2006a, Gunstone, 1991a, Fauconnot et al., 2006, Standal et al., 2011, Broadhurst et al., 2004, Aursand and Grasdalen, 1992, Nieva-Echevarría et al., 2014, Aursand et al., 2006, Aursand et al., 1995, Sacchi et al., 2006, Aursand et al., 1993, Falch and Aursand, 2006, Gunstone and Seth, 1994, Falch, 2006).

3.3 PROGRAMVARE BRUKT I OPPGAVEN

I denne oppgaven er Excel 2016 (Microsoft, USA, versjon 16.0.9226.2114) brukt til å regne ut forholdstall og integraler. Som er gitt i tabeller i oppgaven og vedlegg.

For NMR analysene er TopSpin (Bruker, versjon 3.5p17) brukt til å prosessere spektrene. Programmet er også brukt til å sammenligne av spektre og beregne integraler.

4 RESULTAT OG DISKUSJON

Resultatene og diskusjonen belyser oppgavens formål (kapitel 1). Innledningsvis presenteres prosessuttak og screening. Deretter følger sammenligning av enzymatisk konsentrerte oljer opp mot molekylær destillerte oljer, da med fokus på de uønskede kjemiske endringene som for eksempel oksidasjon og dannelse av polymere forbindelser. Det ble forsøkt å kvantifisere innholdet i prøvene ved å bruke NMR, med tanke på forholdet mellom de forskjellige lipidklassene (TAG, DAG, MAG og EE). NMR spektrene ble også brukt til å se på hvor stor andel n-3 fettsyrer utgjør av den totale mengden fettsyrer i selekterte prøver. Resultatene ble sammenlignet med GC Riebers resultater (HPLC og GC). Sist følger analyse av posisjonering av fettsyrene i TAG, DAG og MAG ved ^{13}C NMR.

4.1 PROSESSUTTAK OG SCREENING

Utgangspunktet for prøve var en etylester olje (36 % EPA, 24 % DHA). Prosessuttaket hos GC Rieber resulterte i 15 oljeprøver (EE). I ettertid fant man en feil på destilleringsutstyret, wiperen i destilleringskammeret manglet under destillasjonen. Dette førte til en ny runde med destillering på senere tidspunkt, 6 nye olje prøver ble laget og sendt til Trondheim. Rådata er gitt i Vedlegg 1.

Halvparten av prøvene var konsentrert med enzymer (17 ADS007 serien i Vedlegg 1) mens resten var konsentrert ved molekylær destillering (18ADS001 serien i Vedlegg 1). Fra den enzymatiske konsentreringen brukes destillatet som produkt som videre re-esterifiseres til TAG, mens restfraksjonen selges som et lavprisprodukt (GC-Rieber, 2017). Fra destilleringen brukes restfraksjonen som produkt mens destillatet blir en slags sidestrøm.

Det ble bestemt å se etter forskjeller i den enzymatisk konsentrerte oljene opp mot de som var oppkonsentrert ved flere runder destillasjon. Formålet var å finne ut om det kunne være uønskede kjemiske endringer i konsentratene. Det var også ønskelig å prøve å kvantifisere innholdet av lipidklassene.

Det ble også ønsket å se nærmere på restfraksjonen fra den enzymatisk konsentrerte oljen, da i forhold til posisjonering av fettsyrene i DAG og til dels MAG. Med tanke på at GC Rieber skal doble kapasiteten for DAG oljer i nær fremtid vil mer informasjon om disse konsentratene være nyttig.

4.2 ENZYMATISK KONSENTRASJON MOT MOLEKYLÆR DESTILLASJON – UØNSKEDE KJEMISKE ENDRINGER

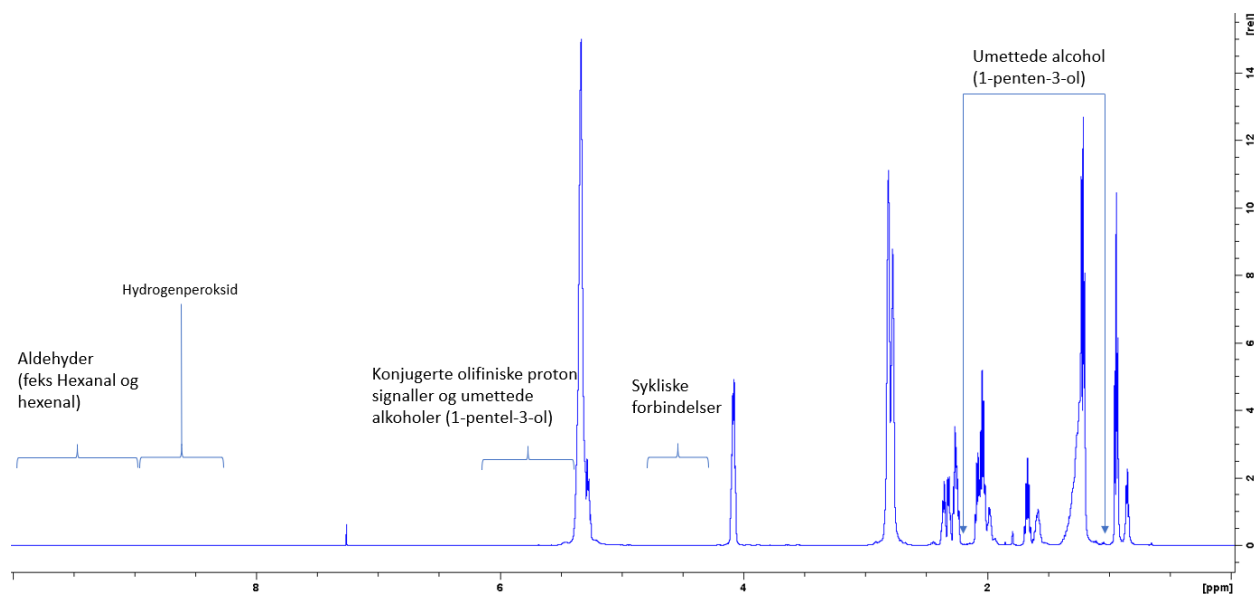
I første omgang gikk arbeidet ut på å se om det var forskjeller mellom oljer laget ved enzymatisk konsentrering mot de som er molekylær destillert flere ganger. Ved å bruke ^{13}C - og ^1H -NMR spektroskopi ble det søkt etter kjemiske endringer som oksidasjon og polymerisering. Slike endringer kan oppstå ved for hard prosessering (høy temperatur, trykk og ugunstig pH) (Haraldsson, 1999, Halldorsson et al., 2003, Haraldsson et al., 1995). ^1H NMR spektrene ble brukt for å søke etter de kjemiske endringene i konsentratene (se Tabell 2) for kjemiske skifte verdier). ^1H NMR er mer sensitiv enn ^{13}C NMR og er derfor en mer egnet metode til å finne slike kjemiske endringer.

Tabell 2 : Oversikt over oksidasjonsprodukter (primær og sekundær) og sykliske forbindelser til ^1H NMR. Hentet fra Falch and Aursand (2006) (A) og Alexandri et al. (2017) (B).

A		B			
^1H substances	Chemical shift values (ppm)	Signal	Chemical Shift (ppm)	Multiplicity	Functional Group
Primary lipid oxidation products:					
Hydroperoxides (-OOH)	8.5 – 8.9	Secondary or Further Oxidation Compounds			
Hydrogens on the peroxy bearing carbon (-CH(COOH))	8.6 – 8.7				
Conjugated dienic olefinic proton multiplets	4.1, 4.3				
Secondary lipid oxidation products					
Aldehydes (-CHO)	9.0 – 10.0	Aldehydes			
Saturated aldehydes	9.3 – 9.8	-CHO	9.49	d	(E)-2-alkenals
Hexanal	9.74	-CHO	9.52	d	(E,E)-2,4-alkadienals
$\alpha\beta$ unsaturated aldehydes	9.48, 9.52, 9.63	-CHO	9.55	d	4,5-epoxy-2-alkenals
trans-2-heptenal, trans-2-octenal	9.48	-CHO	9.57	d	4-hydroxy-(E)-2-alkenals
trans-2-pentenal, trans-2-octenal, trans-2-nonenal	9.5	-CHO	9.58	d	4-hydroperoxy-(E)-2-alkenals
trans,trans-2,4-heptadienal	9.5 and 9.58	-CHO	9.60	d	(Z,E)-2,4-alkadienals
Hexenal	9.74	-CHO	9.75	t	n-alkanals
Unsaturated alcohols (-CH(OH)-)	4.5 – 5.0	-CHO	9.78	t	4-oxo-alkanals
1-penten-3-ol	5.8, 5.15, 4.0, 2.1, 1.5	-CHO	9.79	t	n-alkanals of low molecular weight (ethanal and propanal)
Cyclic compounds					
Cyclic peroxide methane hydrogens (epoxides)	4.5 – 4.7, 4.4	Alcohols			
		-CHOH-CHOH-	3.43	m	9,10-dihydroxy-12-octadecenoate (leukotaxindiol)
Groups of hydrogens					
Aliphatic hydrogens	0.6 – 2.5	-CHOH-	3.54–3.59	m	secondary alcohols
Diallylmethylene hydrogens (=C-CH ₂ -C=)	2.6 – 2.9	-CH ₂ OH-	3.62	t	primary alcohols
Olefinic hydrogens (-CH=CH-)	5.1 – 5.6	Epoxides			
Unsaturated fatty acids					
Unsaturated fatty acids (-CH=CH-)	5.35	-CHOHC-	2.63	m	(E)-9,10-epoxystearate
Unsaturated fatty acids (CH ₂ -CH=CH-)	2.0	-CHOHC-	2.88	m	(Z)-9,10-epoxystearate
Polysaturated fatty acids (=CH-CH ₂ -CH=)	2.81–2.84	-CHOHC-	2.90	m	9,10-epoxy-octadecanoate; 9,10-epoxy-12-octadecenoate (leukotoxin); 12,13-epoxy-9-octadecenoate (isoleukotoxin)
n-3 fatty acids (-CH ₃)	0.896, 0.833	-CHOHC-CHOHC-	2.90	m	9,10-12,13-diepoxy octadecanoate
		-CHOHC-CH ₂ -CHOHC-	3.10	m	9,10-12,13-diepoxy octadecanoate
Ketones and Unidentified					
		O=C-CH=CH-	6.08	dt	Double bond conjugated with a keto group
			6.82	m	
		Unidentified	7.50	-	Unidentified
		Unidentified	8.10	-	Unidentified

d, doublet; t, triplet; m, multiplet.

I Figur 12 blir prøve 18ADS001 R vist for å illustrere hvor i spektrene man kan finne de uønskede kjemiske endringene. Ved gjennomgang av spektrene ble det ikke funnet målbare mengder hydrogenperoksid eller aldehyder i noen av prøvene. Det ble også søkt etter den sykliske forbindelsen 2-etylfuran etter ønske fra samarbeidsbedriften, men det var ikke mulig å finne denne forbindelsen i ^1H spektrene da området man finner den i har mye signaler fra andre komponenter. Det ble derfor bruk ^{13}C NMR for å se nærmere på denne forbindelsen, uten at disse spektrene heller ikke viste målbare signaler til denne forbindelsen. Dette kan indikere at man har hatt god kontroll på molekylær destillasjonsprosessen, da i forhold til riktig temperatur og trykk (Fregolente et al., 2006, GC-Rieber, 2017). En annen mulighet er at råoljen har blitt raffinerte tilstrekkelig og dermed blitt tilnærmet fri for slike forbindelser som følge av riktig utført bleking og deodorisering (Gunstone, 2004, Jacobsen et al., 2009, Aursand et al., 2011).

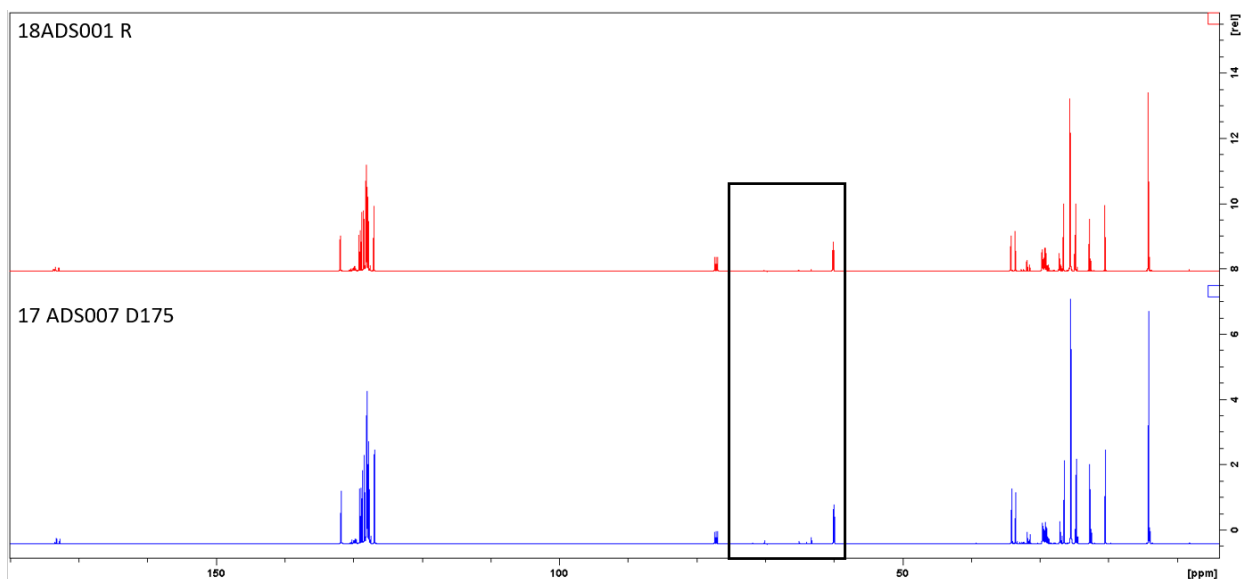


Figur 12: ^1H NMR spekter (10-0 ppm). Her fra prøve 18ADS001 R, ingen målbare uønskede kjemiske endringer påvist.

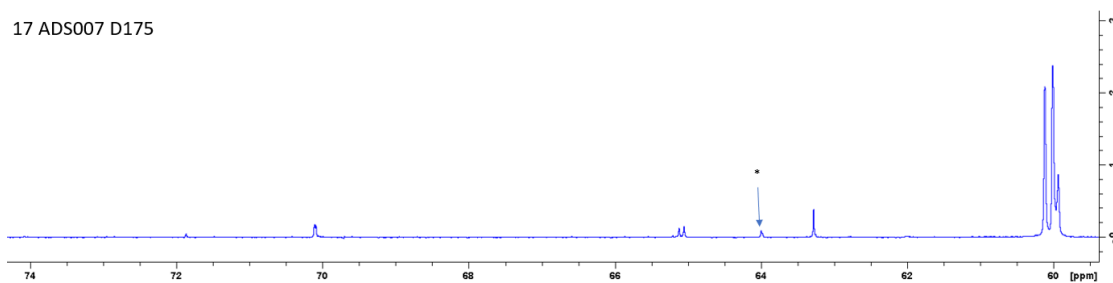
Det ble også utført sammenligning av de enzymatisk- og molekylær destillerte produktene ved bruk av ^{13}C NMR. Dette for å se om noen forbindelser kan ha druknet i overlappende signaler på ^1H NMR kunne vise seg i det bredere spekteret til ^{13}C . Det ble ikke funnet store forskjeller utover det man kunne forvente i form av forskjellige konsentrasjoner av lipidklasser. I Figur 13 ser man at de mest åpenbare forskjellene kommer i glyserol regionen (75-60 ppm) som følge av forskjellige konsentrasjoner av TAG, DAG, MAG og EE. De fleste konsentratene er i etylester-

form (>90 %), unntatt restfraksjonene fra den enzymatiske konsentreringen. Enzymatisk konsentrerte restfraksjoner hadde mellom 1 til 30 % EE.

I ^{13}C spektrene til oljene konsentrert med enzymer dukket det opp en topp som ikke er identifisert per dags dato, ifølge Standal et al. (2017) kan dette signalet stamme fra et biprodukt fra den enzymatiske reaksjonen (Figur 14). HSQC spektrene ble også tatt i bruk for å se på toppen som kunne indikere andre forskjeller, uten resultat.



Figur 13: Destillert olje (18ADS001 R) opp mot en olje konsentrert med enzymer (17 ADS007 D175). ^{13}C NMR spekter (180-0 ppm). Glycerol region (75-60 ppm) uthøvet på grunn av forskjeller i den regionen.



Figur 14: Utdrag av glycerol regionen i ^{13}C spekter fra prøve 17 ADS007 D175, * viser en uidentifisert topp som går igjen i alle prøvene som er av enzymatisk opphav.

Karbonyl regionen (174-172) av ^{13}C spektrene ble sammenlignet, men det var vanskelig å bruke informasjonen i den delen av spekteret på grunn av dårlig separasjon av toppene. Dette er mest

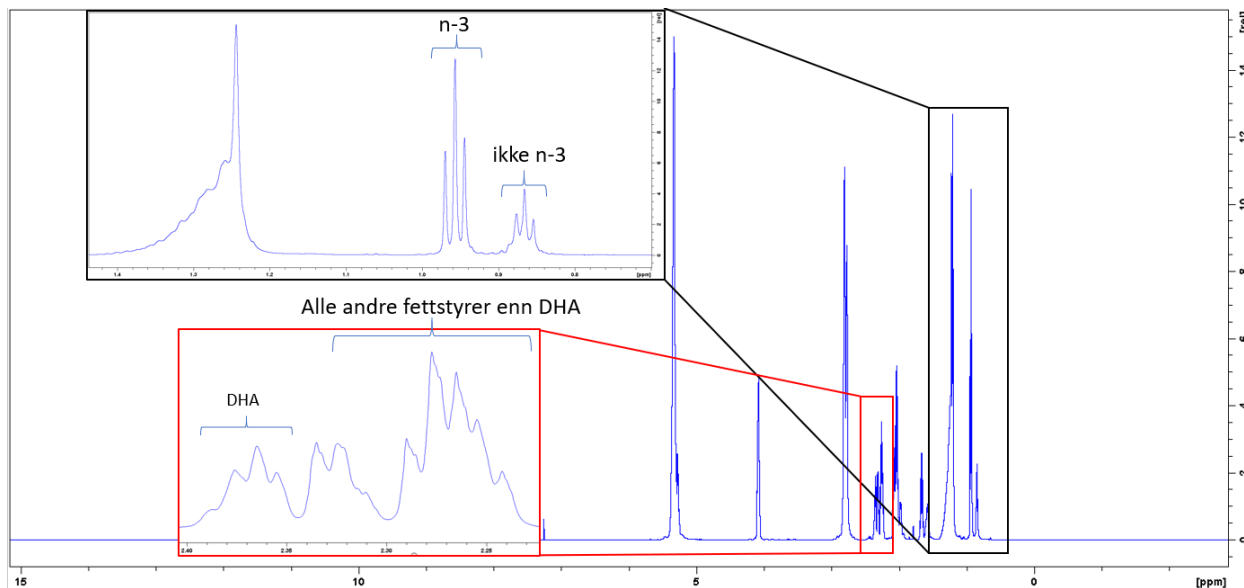
sannsynlig et resultat av feil innstillinger på programmet til NMR eksperimentet. Forsøkene skulle vært kjørt over lengre tid og med høyere relaksasjonstid.

4.3 RELATIVT INNHOLD AV LIPIDKLASSER

Det ble gjort forsøk på å kvantifisere, da med tanke på forholdet mellom lipidklassene og andelen n-3 fettsyrer i prøvene. Ved å integrere arealet i gitte områder av spektrene kan man bestemme forholdet mellom ønskede komponenter. ^1H NMR er svært sensitiv sammenlignet med ^{13}C NMR og egner seg derfor godt til kvantifisering av innhold, gitt at den får separert toppene godt nok. Det kan forekomme en del overlappende signaler i et slikt spekter.

Man bør være obs på at man ikke kan sammenligne tall fra GC med NMR resultater direkte, da GC oppgir resultatene i areal% og vil vise ca. 10 % høyere verdier enn resultater fra ^1H NMR som oppgir resultatene på mol basis (mol %).

For å bestemme det relative innholdet av n-3 fettsyrer i oljen må man bruke integralet fra toppene mellom 1,4-0,7 ppm i ^1H NMR (svarte utdraget Figur 15). Man kan bestemme forholdet mellom DHA og alle andre fettsyrer i prøven ved å se på regionen 2,40-2,20 (utdrag i rødt på Figur 15) (Siddiqui et al., 2003).



Figur 15: ^1H spekter med utdrag fra to regioner: Svart (1,4-0,7 ppm) viser hvor man kan bestemme forholdet mellom omega-3 og andre fettsyrer, rødt (2,40-2,20 ppm) hvor man kan bestemme andelen DHA.

Resultatene i Tabell 3 viser at det er forskjell mellom tradisjonelle metoder og NMR. Det er verdt å merke seg at DHA resultatene skiller seg ut, dette kan ha sammenheng med til dels dårlig separering av toppene i spektrene. En annen feilkilde kan være at under gasskromatografi kan varmen fra kolonneovnen påvirke DHA/EPA resultatene som følge av «kunstig oksidasjon» (Siddiqui et al., 2003).

Tabell 3: Resultater fra GC Rieber og beregninger fra NMR. * Usikkerhet rundt TAG sn-1,3, 1,2DAG sn3 og 2MAG sn-1,3.

Navn	Prøve ID	GC Rieber resultater							NMR resultater						
		EPA	DHA	n-3 totalt	TAG	DAG	MAG	EE	EPA	DHA	n-3 total	TAG *	DAG *	MAG*	EE
A	17 ADS007 R195	47.40	14.01	70.86	2.81	78.97	16.95	1.27	-	19.84	67.16	4.88	72.53	21.93	0.65
B	17 ADS007 R155	39.65	28.82	76.97	1.76	50.07	15.32	32.85	-	22.84	73.96	3.24	51.72	22.08	22.97
C	Feed 17ADS008	42.57	29.28	79.89	0.09	0.27	1.01	98.64	-	22.33	76.18	-	0.36	0.83	98.81
D	18ADS001 R	39.88	33.30	81.42	0.13	0.30	0.37	99.20	-	26.75	76.38	-	0.76	1.54	97.69
E	17 ADS007 D175	38.60	40.00	85.69	-	0.09	4.11	95.80	-	29.38	79.20	0.25	2.74	6.49	90.53

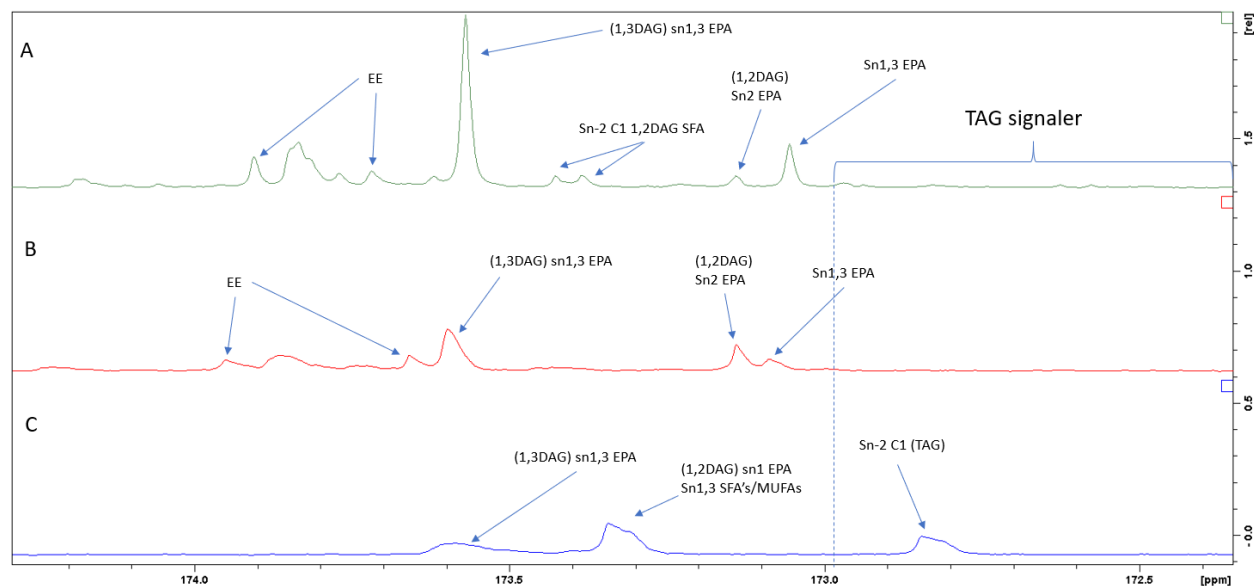
4.4 LIPIDKLASSE POSISJONERING

Det ble regnet ut forholdet mellom TAG, DAG, MAG og EE i de utvalgte prøvene (Tabell 3), ettersom posisjonering kan ha en del å si for opptaket av fettsyrer i kroppen (Calder, 2012) er det sett på posisjonering av fettsyrene innad i lipidklassene.

Det skal i utgangspunktet være svært lite TAG i oljene som er analysert i denne studien, noe som ble bekreftet ved inspeksjon av ¹³C spektrene. Ved å se spesifikt på glyserol- (72-61 ppm) og karbonylregionen (174-172 ppm) vil man se signalene for TAG. I karbonylregionen ble ikke toppene skikkelig separert og dette medførte at det var vanskelig å identifisere alle toppene. Som man kan se i Figur 16 er det kun prøve C som har utpreget signal i området man skal se TAG signaler, denne toppen er ikke godt egnet til identifisering da den er veldig tykk og rund. At det er lite signaler av TAG samsvarer med resultatene fra GC Rieber, ifølge tilsendte resultater skal det være små mengder (0-3 %) TAG i oljene som er analysert i studien.

På grunn av parameterne til ¹³C NMR eksperimentet som ble kjørt i denne studien er spektrene i karbonylregionen ikke helt optimale. Med riktige parametere vil man få tydelig separerte topper som er bedre egnet til å måle forholdet mellom de forskjellige fettsyrene i TAG form. Parameterne burde vært med flere data punkt, en lengre forsinkelse mellom pulsene for å få bedre resonans fra kjernene i prøven (Siddiqui et al., 2003). For å identifisere topper i

karbonylregionen ble resultater fra tidligere forsøk brukt, da hovedsakelig fra (Aursand et al., 2007, Hatzakis et al., 2011, Standal et al., 2017, Standal et al., 2011, Suárez et al., 2010).

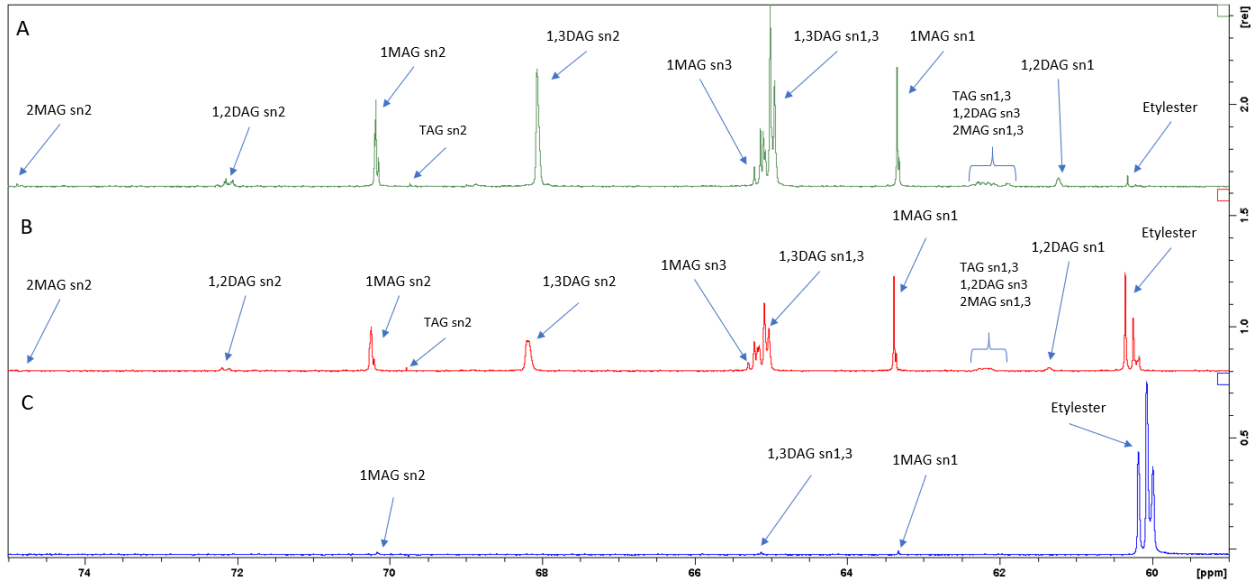


Figur 16: Utdrag fra ^{13}C spektre av karbonyl regionen (175-172,5 ppm). Tabell 3 for informasjon om prøvene.

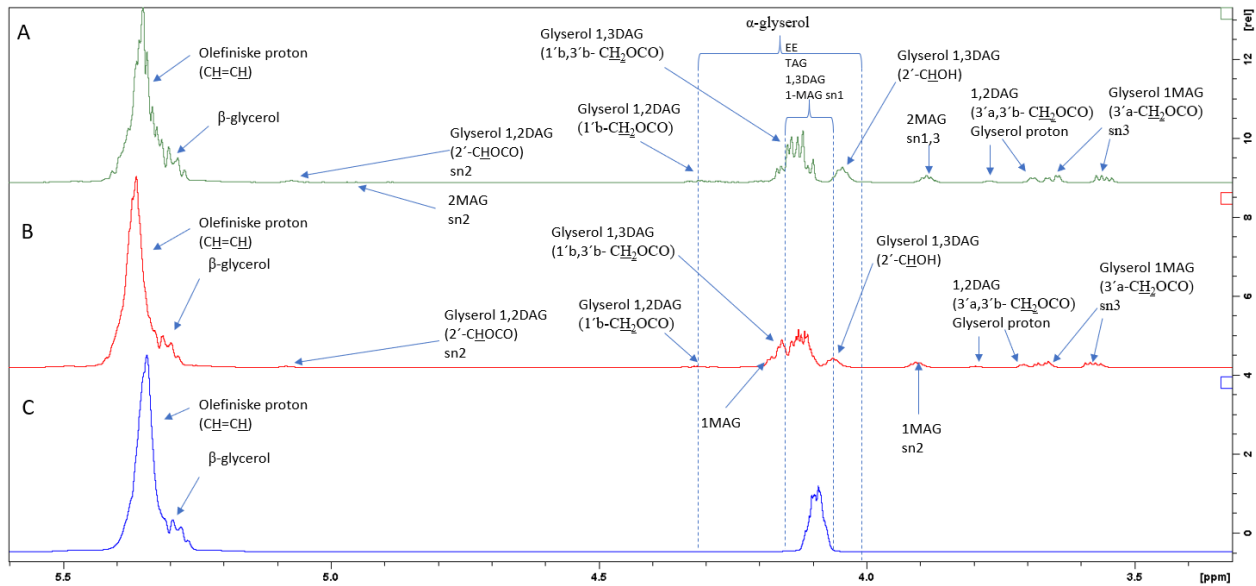
I restfraksjonen fra den enzymatiske oppkonsentreringen er det en høy andel DAG (50-70 %), det kan derfor være verdifullt å finne ut hvilke posisjoner fettsyrene har i DAG. Dette vil gi informasjon om hvordan den enzymatiske prosessen har foregått, og gi mer informasjon som man kan utnytte til å lage nye produkter av denne fraksjonen. Det er lagt vekt på prøve A og B når det ble sett på DAG. Man får best oversikt over DAG i signalområdet 75-60 ppm på ^{13}C og mellom 5,5 til 3,5 ppm på ^1H NMR. For å beregne forholdstallene til DAG ble ^{13}C spektrene brukt, dette for ^1H har en del overlappende signaler som ikke gjør det like godt egnet til dette (eksempel på dette kan ses i Figur 17 og Figur 18). Resultatene viser at hoveddelen DAG er av 1,3DAG hvor av ca. 2/3 av den er i sn-1,3 posisjon. Resultatene samsvarer med at det er mest EPA i oljene om har mye DAG i sn-1,3 posisjon da enzymer lettere plukker av fettsyrer i sn-2 posisjon. Fiskeartene anchoveta og sardin som råstoff fra har som oftest EPA i sn-1,3 posisjon. Tolkningen av spektrene er gjort på bakgrunn av tidligere studier: (Zamora and Hidalgo, 2006, Nieva-Echevarría et al., 2014, Hatzakis et al., 2011, Standal et al., 2017, Siddiqui et al., 2003).

Tabell 4: Posisjoneringsforhold i MAG, DAG og TAG. * Usikkerhet rundt TAG sn-1,3, 1,2DAG sn3 og 2MAG sn-1,3.

Navn	Prøve	MAG					DAG					TAG	
		1MAG sn-1	1MAG sn-2	1MAG sn-3	2MAG sn-1,3 (*)	2MAG sn-2	1,2DAG sn-1	1,2DAG sn-2	1,2DAG sn-3 (*)	1,3DAG sn-1,3	1,3DAG sn-2	TAG sn-2	TAG sn-1,3 (*)
A	17 ADS007 R195	42.32	47.31	9.64	-	0.73	2.59	2.88	-	62.90	31.63	14.79	85.21
B	17 ADS007 R155	45.46	46.60	7.71	-	0.23	2.43	2.41	-	65.63	29.53	16.10	83.90
C	Feed 17ADS008	50.00	50.00	-	-	-	-	-	-	100.00	-	-	-
D	18ADS001 R	54.43	45.57	-	-	-	-	-	-	100.00	-	-	-
E	17 ADS007 D175	48.88	48.18	2.94	-	-	-	-	-	100.00	-	-	100.00



Figur 17: Utdrag av glyserol regionen (75-60 ppm) på ^{13}C NMR spekter. MAG, DAG og TAG posisjonering. Se Tabell 3 og Tabell 4 for utfyllende prøveinformasjon.



Figur 18: Utdrag fra ^1H spekter (5,5-3,5 ppm). Se Tabell 3 og Tabell 4 for utfyllende informasjon om prøvene.

Tabell 4 viser at fordelingen av 1MAG er fordelt hovedsakelig i sn-1 og sn-2 posisjon (42-55 % sn-1, 45-50 % sn-2) mens det er betraktelig mindre sn-3 (2-9 %). 1MAG sn-3 har en liten topp svært nære 1,3DAG sn-1,3 og kan dermed ha en forhøyet areal i forhold til det som er reelt. Det er funnet små signaler fra 2MAG, på grunn av spektrenes ujevne baselinje ved oppskalering vil det kunne være en liten feilmargin i integreringen av toppene.

4.5 OPPSUMMERING AV RESULTATER OG DISKUSJON

Målene for oppgaven var å se om det var forskjell på oljene som er konsentrert på enzymatisk vis kontra de som er konsentrert ved flere destilleringer, kvantifisere innholdet i oljene for å sammenligne tradisjonelle analyse resultater med NMR analysene, samt å se på fettsyreposisjoneringen i de selekterte prøvene som er analysert (inkludert sidestrømmer).

Ut fra denne studien kan man ikke entydig si at enzymatisk konsentrering er bedre eller dårligere enn molekylær destillasjon med tanke på uønskede kjemiske endringer som følge av prosessene.

Det gikk delvis greit å kvantifisere innholdet i oljene om man skulle se på det relative forholdet for de forskjellige lipidklassene. For å kvantifisere skikkelig bør man benytte internstandard i prøvene og ha tilpassede analyseparametere på NMR eksperimentene.

Resultatene viser at den største andelen DAG er i form av 1,3DAG sn-1,3. Ettersom oljene som ble analysert hovedsakelig besto av etylester og veldig små mengder TAG (sn-1,3 posisjon hovedsakelig) var det DAG som var den lipidklassen som var av størst interesse.

5 KONKLUSJON

Det kan konkluderes med at NMR (^1H , ^{13}C og HSQC) er en god metode for å følge sammensetningen av ulike produktstrømmer gjennom oppkonsentrering av omega-3 produkter. Metoden gir veldig mye informasjon i forhold til tradisjonelle metoder, da spesielt med tanke på posisjonering av fettsyrene innad i lipidklassene. Den egner seg også godt til å se på uønskede kjemiske endringer underveis i en prosess av slike produkt, da gjerne sammen med de konvensjonelle metodene man utfører på HPLC og GC for å få et helhetlig bilde av hva som er i prøvene.

Det er nærliggende å tro at GC Riebers prosessering av raffinert olje er skånsom og godt kontrollert. Etersom man ikke kunne måle identifiserbare signaler for de mest kjente oksidasjonsproduktene i slike produkt. Fra resultatene i denne studien kan det ikke konkluderes med at enzymatisk konsentrerte oljer er bedre eller dårligere enn oljer som er konsentrert ved molekylær destillasjon.

På grunn av sub-optimale analyseparametere på NMR-programmene kunne man ikke besvare alle spørsmålene som ble stilt i denne oppgaven tilstrekkelig.

6 VIDERE ARBEID

Denne studien har vist at det er mulig å se på lipidklassenes posisjonering. Det anbefales derfor at fremtidige studier benytter seg av tilsvarende metode, men med høyere nøyaktighet. For å oppnå høyere nøyaktighet må NMR eksperimentene ha flere skanner, kjøre over lengre tid for å få god separasjon av toppene i spektrene. Dette gjelder både ^1H og ^{13}C NMR, med tanke på 2D spektre kan det være interessant å kjøre COSY (^1H - ^1H) program for å se mer detaljert på eventuelle oksidasjonsprodukter eller sykliske forbindelser.

Det ville nok være veldig lærerikt og interessant å kunne ta ut prøver gjennom hele raffineringprosessen for å se hvordan endringene forekommer i en slikprosess på NMR. Ikke bare fra selve oppkonsentreringstrinnet. Det kunne også vært interessant å følge prosessen videre for å se hvordan fettsyrene ville posisjonert seg etter en re-esterifisering til TAG.

Ettersom det er framstilt påstander om helseeffekter på DAG oljer til EFSA og ett stort fokus på å utnytte sidestrømmer vil det være veldig interessant med flere studier på marine DAG oljer, da man eventuelt kan vise til to helsefremmende effekter i form av både omega-3 og DAG. Desto mer informasjon man kan samle om DAG og marine oljer desto større sannsynlighet vil det være for at EFSA kan gå god for slike produkter med helsepåstander på markedene i EU.

7 VEDLEGG

7.1 VEDLEGG 1 – UTFYLLENDE INFORMASJON FOR PRØVENE I STUDIEN

Prøvenummer	Prøve ID	Beskrivelse	Dato	EPA	DHA	n-3
17-7911	17 ADS007 D155		13.12.2017/18.12.2017 14:00	46.33	28.22	81.85
17-7912	17 ADS007 D175		13.12.2017/18.12.2017 14:00	38.6	40	85.69
17-7913	17 ADS007 D195		13.12.2017/18.12.2017 14:00	36.69	42.05	85.79
17-7914	17 ADS007 R155		13.12.2017/18.12.2017 14:00			
17-7915	17 ADS007 R175		13.12.2017/18.12.2017 14:00			
17-7916	17 ADS007 R195		13.12.2017/18.12.2017 14:00			
17-7917	Feed 17ADS008		18/12/2017 15:30	42.57	29.28	79.89
17-7918	17ADS008- 3624 EE	D 7,8 %	18.12.2017 15:10/15:30	50.78	11.31	69.63
17-7919	17ADS008- 3624 EE	R 92,2 %	18.12.2017 15:10/15:30	41.58	31.38	81.07
17-7954	17ADS008-D	Fat prøve	19.12.2017 09:35/11:30	50.2	11.29	69.01
17-7955	17ADS008-R	Fat prøve	19.12.2017 09:35/11:30	41.62	31.27	80.94
17-7956	17ADS009-D	15 % D	19.12.2017 12:30/14:30	42.37	27.87	78.57
17-7957	17ADS009-R	85 % R	19.12.2017 12:30/14:30	40.81	31.38	80.48
17-7958	17ADS009-D	19 % D	19.12.2017 13:45/14:30	43.71	27.05	78.85
17-7959	17ADS009-R	81 % R	19.12.2017 13:45/14:30	40.41	32.21	80.95
18-0203	18ADS001 D	24% D	12.01.2018 11:30/15:15	51.9	14.1	73.4
18-0204	18ADS001 R	76% R	12.01.2018 11:30/15:15	37.64	36.42	82.48
18-0205	18ADS001	10% D	12.01.2018 12:15/15:15	51.82	12.61	71.92
18-0206	18ADS001	90% R	12.01.2018 12:15/15:15	39.88	33.3	81.42
18-0207	18ADS001	16% D, flaske 1	12.01.2018 13:00/15:15	52	12.73	70.13
18-0208	18ADS001	16% D, flaske 2	12.01.2018 13.00/15:15	52.14	14.6	72.21
18-0209	18ADS001	84% R	12.01.2018 13:00/15:15	39.21	35.11	80.94

Fortsetter på neste side

EPA met	DHA met	n-3 met	TG	DG	MG	EE
			0.09	0.76	2.41	96.74
				0.09	4.11	95.8
				0.03	6.89	93.08
39.65	28.82	76.97	1.76	50.07	15.32	32.85
45.1	17.86	72.19	2.96	70.59	19.66	6.79
47.4	14.01	70.86	2.81	78.97	16.95	1.27
			0.09	0.27	1.01	98.64
				0.49	1.16	98.35
			0.14	0.56	1.03	98.27
				0.04	0.14	99.82
			0.15	0.47	0.96	98.42
			0.1	0.56	0.73	98.6
			0.8	1.31	3.36	94.53
			0.54	0.71	1.73	97.02
			0.18	0.85	1.86	97.11
				0.15	93.76	93.76
			0.19	0.55	1.97	97.29
				0.13	0.16	99.71
			0.13	0.3	0.37	99.2
				0.26	0.33	99.41
				0.24	0.32	99.44
			0.17	0.45	1.1	98.28

8 LITTERATURLISTE

- ALEXANDRI, E., AHMED, R., SIDDIQUI, H., CHOUDHARY, M. I., TSIAFOULIS, C. G. & GEROTHANASSIS, I. P. 2017. High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules*, 22, 1663.
- AMIN, M. H. G., VAN DEN BERG, F., BONNY, J.-M., BRO, R., CAPOZZI, F., DUUS, J., FALCH, E., FERREIRA, A. G., GOSTAN, T. & HILLS, B. 2007. *Magnetic Resonance in Food Science: The Multivariate Challenge*, Royal Society of Chemistry.
- AUE, W., KARHAN, J. & ERNST, R. 1976. Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics*, 64, 4226-4227.
- AURSAND, M. & GRASDALEN, H. 1992. Interpretation of the ¹³C-NMR spectra of omega-3 fatty acids and lipid extracted from the white muscle of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Chem. Phys. Lipids*, 62, 251.
- AURSAND, M., GRIBBESTAD, I. S. & MARTINEZ, I. 2006. Omega-3 Fatty Acid Content of Intact Muscle of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Examined by ¹H MAS NMR Spectroscopy. In: WEBB, G. A. (ed.) *Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- AURSAND, M., JØRGENSEN, L. & GRASDALEN, H. 1995. Positional distribution of ω3 Fatty acids in marine lipid triacylglycerols by high-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 293-297.
- AURSAND, M., MOZURAITYTE, R., HAMRE, K., KNUTSEN, H., MAAGE, A. & ARUKWE, A. 2011. Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils. *Oslo, Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM)*.
- AURSAND, M., RAINUZZO, J. R. & GRASDALEN, H. 1993. Quantitative high-resolution ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance of omega-3 fatty acids from white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 981.

- AURSAND, M., STANDAL, I. B. & AXELSON, D. E. 2007. High-Resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Pattern Recognition of Fish Oil Capsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 38-47.
- BALCI, M. 2005. *Basic ¹H- and ¹³C-NMR Spectroscopy*, Oxford, NETHERLANDS, Elsevier Science.
- BEKKEVOLD, S. & OLAFSEN, T. 2007. *Råvarer med muligheter: marine biprodukter*, Trondheim, RUBIN.
- BERGER, S. & BRAUN, S. 2004. *200 and more NMR experiments*, Wiley-Vch Weinheim.
- BRESCIA, M. A. & SACCO, A. 2006a. High-Resolution ¹H Nuclear Magnetic Resonance in the Study of Oils. *In: WEBB, G. A. (ed.) Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- BRESCIA, M. A. & SACCO, A. 2006b. High-Resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance in the Study of Oils. *In: WEBB, G. A. (ed.) Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- BROADHURST, C. L., SCHMIDT, W. F., CRAWFORD, M. A., WANG, Y. & LI, R. 2004. ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of natural undiluted lipids: docosahexaenoic-rich phospholipid and triacylglycerol from fish. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 4250-4255.
- CALANUS, A. 2017. Calanus As is granted Novel Food approval for Calanus® Oil in the EU. *In: AS, C. (ed.)*. <https://www.calanus.no/>: Calanus AS.
- CALDER, P. C. 2012. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids, 2. *The Journal of nutrition*, 142, 592S-599S.
- CVENGROŠ, J., LUTIŠAN, J. & MICOV, M. 2000. Feed temperature influence on the efficiency of a molecular evaporator. *Chemical Engineering Journal*, 78, 61-67.
- EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, N. & ALLERGIES 2011. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to diacylglycerol (DAG) oil and reduction of body weight pursuant to Article 13 (5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9, 2469.
- FALCH, E. 2006. Lipids from residual fish raw materials: Quality assessment by advanced analytical methods.

- FALCH, E., ANTHONSEN, H. W., AXELSON, D. E. & AURSAND, M. 2004. Correlation between ¹H NMR and traditional methods for determining lipid oxidation of ethyl docosahexaenoate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 1105.
- FALCH, E. & AURSAND, M. 2006. Resonance Spectroscopy to Study Lipid Oxidation in Fish and Fish Products. In: WEBB, G. A. (ed.) *Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- FALCH, E., STORSETH, T. R. & AURSAND, M. 2005. HR NMR To Study Quality Changes In Marine By-Products. *Magnetic Resonance in Food Science: The Multivariate Challenge*. The Royal Society of Chemistry.
- FAUCONNOT, L., ROBERT, F., VILLARD, R. & DIONISI, F. 2006. Chemical synthesis and NMR characterization of structured polyunsaturated triacylglycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*, 139, 125-136.
- FREGOLENTE, L., MORAES, E., MARTINS, P., BATISTELLA, C., MACIEL, M., AFONSO, A. & REIS, M. Enrichment of natural products using an integrated solvent-free process: Molecular distillation. INSTITUTION OF CHEMICAL ENGINEERS SYMPOSIUM SERIES, 2006. Institution of Chemical Engineers; 1999, 648.
- FRØYLAND, L., ARUKWE, A., BENTSEN, H., BERNHOFT, A., FRØLICH, W., GRAFF, I. E., HALVORSEN, R., HEMRE, G. I., HAUGEN, M. & IVERSEN, P. O. 2011. Evaluation of negative and positive health effects of n-3 fatty acids as constituents of food supplements and fortified Foods. Opinion of the Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. *VKM Report*.
- GC-RIEBER, O. A. 2017. RE: *Personlig kommunikasjon fra Hanne S. Felberg*. Type to HANSEN, A.
- GREIBROKK, T., LUNDANES, E., RASMUSSEN, K. E. & KARLSEN, J. 2005. *Kromatografi : separasjon og deteksjon*, Oslo, Pensumtjeneste.
- GUNSTONE, F. 1991a. High resolution NMR studies of fish oils. *Chemistry and physics of lipids*, 59, 83-89.
- GUNSTONE, F. D. 1991b. ¹³C-NMR studies of mono-, di-and tri-acylglycerols leading to qualitative and semiquantitative information about mixtures of these glycerol esters. *Chemistry and Physics of Lipids*, 58, 219-224.

- GUNSTONE, F. D. 2004. The chemistry of oils and fats. *Sources, Composition, Properties and Uses*. Great Britain: Blackwell Publishing Ltd. 345p.
- GUNSTONE, F. D. & SETH, S. 1994. A study of the distribution of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid between the α and β glycerol chains in fish oils by ^{13}C -NMR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, 72, 119-126.
- HALLDORSSON, A., KRISTINSSON, B., GLYNN, C. & HARALDSSON, G. G. 2003. Separation of EPA and DHA in fish oil by lipase-catalyzed esterification with glycerol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 915-921.
- HARALDSSON, G. G. 1999. The application of lipase for preparing various lipids enriched with omega-3 fatty acids. *RIT FISKIDEILD*, 16, 97-106.
- HARALDSSON, G. G., GUDMUNDSSON, B. Ö. & ALMARSSON, Ö. 1995. The synthesis of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase. *Tetrahedron*, 51, 941-952.
- HATZAKIS, E., AGIOMYRGIANAKI, A., KOSTIDIS, S. & DAIS, P. 2011. High-resolution NMR spectroscopy: an alternative fast tool for qualitative and quantitative analysis of diacylglycerol (DAG) oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1695-1708.
- HELSEDIREKTORATET. 2011. *Essensielle fettsyrer (omega-6 og omega-3)* [Online].
www.matportalen.no. Available:
http://www.matportalen.no/kosthold_og_helse/tema/naringsstoffer/essensielle_fettsyrer_omega-6_og_omega-3 [Accessed 20.03.2018 2018].
- HO, W. F., PRICHARD, E. R. & STUART, B. 2003. *High performance liquid chromatography*, Royal Society of Chemistry.
- IGLESIAS, J. & MEDINA, I. 2008. Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *Journal of Chromatography A*, 1192, 9-16.
- JACOBSEN, C., RUSTAD, T., NIELSEN, N., FALCH, E., JANSSON, S. & STORRØ, I. 2009. Processing of marine lipids and factors affecting their quality when used for functional foods. *Marine functional food*, 89-114.
- KEELER, J. 2011. *Understanding NMR spectroscopy*, John Wiley & Sons.

- MARTTINELLO, M., LEONE, I. & PRAMPARO, M. 2008. Simulation of deacidification process by molecular distillation of deodorizer distillate. *Latin American applied research*, 38, 299-304.
- NIEVA-ECHEVARRÍA, B., GOICOECHEA, E., MANZANOS, M. J. & GUILLÉN, M. D. 2014. A method based on ¹H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *Food Research International*, 66, 379-387.
- RESEARCH, G. V. 2018. Omega 3 Market Size, Share & Trend Analysis Report By Application (Supplements & Functional Foods, Pharmaceuticals, Infant formulas, Pet & Animal Feed), By Region, And Segment Forecasts, 2012 - 2022.
- SACCHI, R., SAVARESE, M., FALCIGNO, L., GIUDICIANNI, I. & PAOLILLO, L. 2006. Proton NMR of Fish Oils and Lipids. In: WEBB, G. A. (ed.) *Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- SIDDIQUI, N., SIM, J., SILWOOD, C. J., TOMS, H., ILES, R. A. & GROOTVELD, M. 2003. Multicomponent analysis of encapsulated marine oil supplements using high-resolution ¹H and ¹³C NMR techniques. *Journal of lipid research*, 44, 2406-2427.
- STANDAL, I. B. 2009. Use of NMR spectroscopy in combination with pattern recognition techniques for elucidation of origin and adulteration of foodstuffs.
- STANDAL, I. B., AXELSON, D. E. & AURSAND, M. 2011. Authentication of marine oils using ¹³C NMR spectroscopy. *Lipid Technology*, 23, 152-154.
- STANDAL, I. B., CARVAJAL, A. K., MOZURAITYTE, R., STORRØ, I., STØRSETH, T., ABBASI, E. & AURSAND, M. 2017. High-Resolution NMR as Tool to Study Enzyme-Catalyzed Production of Fatty Acid Ethyl esters from Marine Oils.
- SUÁREZ, E. R., MUGFORD, P. F., ROLLE, A. J., BURTON, I. W., WALTER, J. A. & KRALOVEC, J. A. 2010. ¹³C-NMR Regioisomeric Analysis of EPA and DHA in Fish Oil Derived Triacylglycerol Concentrates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 1425-1433.
- WIJESUNDERA, C., CECCATO, C., WATKINS, P., FAGAN, P., FRASER, B., THIENHONG, N. & PERLMUTTER, P. 2008. Docosahexaenoic Acid is More Stable to Oxidation when Located

at the sn-2 Position of Triacylglycerol Compared to sn-1(3). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 543-548.

YANAI, H., TOMONO, Y., ITO, K., FURUTANI, N., YOSHIDA, H. & TADA, N. 2007. Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome. *Nutrition Journal*, 6, 43.

ZAMORA, R. & HIDALGO, F. J. 2006. Determination of Fatty Acid Composition and Oxidation in Fish Oils by High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *In: WEBB, G. A. (ed.) Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht: Springer Netherlands.